

# **CAMBIOS TRADUCCIONALES QUE REGULAN LA INTERACCIÓN VIRUS HOSPEDADOR. IMPLICACIÓN EN EL DESARROLLO DE VIRUS ONCOLÍTICOS**

*Memoria presentada por:*

***FCO. RENÉ TORIBIO LÓPEZ***

*para optar al grado de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.*

Trabajo dirigido por Iván Ventoso Bande, realizado en el Centro de Biología Molecular  
“Severo Ochoa” (UAM-CSIC). 28049 Cantoblanco (Madrid)



*Facultad de Ciencias Departamento de Biología Molecular  
Octubre, 2010*





# ÍNDICE

## ABREVIATURAS

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>11</b>
A. ELEMENTOS DEL ARNm .....	12
B. LA ESTRUCTURA SECUNDARIA Y TERCIARIA DEL ARNm .....	15
C. INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN .....	18
Reclutamiento de los ribosomas al ARNm .....	19
Rastreo o <i>scanning</i> en busca del codón de iniciación .....	22
Introducción del <i>Met-tRNAi</i> .....	23
D. eIF2 Y SUS QUINASAS .....	23
E. PKR Y LA RESPUESTA ANTIVIRAL .....	27
F. ALTERACIONES TRADUCCIONALES EN CÉLULAS	
INFECTADAS POR VIRUS .....	33
G. ALFAVIRUS .....	36
H. ALTERACIONES TRADUCCIONALES EN CÁNCER .....	40
Alteraciones en la actividad del complejo eIF4F .....	40
Incremento de la actividad S6 quinasa .....	42
Niveles de fosforilación de eIF2 .....	43
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>47</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>49</b>
A. Bacterias y clonación .....	49
A.1. Cepas, crecimiento y preservación .....	49
A.2. Competencia y transformación .....	50

---

B. Plásmidos y clones infecciosos .....	51
B.1. Plásmidos empleados .....	51
B.2. Construcción de virus recombinantes de SV.....	52
B.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	54
B.4. Electroforesis de agarosa y purificación de fragmentos de ADN .....	55
B.5. Ligación.....	55
C. Cultivos Celulares .....	56
C.1. Mantenimiento y medios de cultivo.....	57
C.2. Congelación de células .....	58
D. Obtención de virus recombinantes .....	59
D.1 Transcripción <i>in vitro</i> .....	59
D.2 Electroporación del ARN viral .....	60
D.3 Material infeccioso: Los virus .....	60
E. Purificación de partículas infecciosas.....	61
E.1. Colchón de sacarosa .....	61
E.2. Precipitación con polietilenglicol (PEG).....	62
F. Titulación de las preparaciones virales .....	62
G. Homogeneidad de los recombinantes .....	63
H. Infecciones <i>in vitro</i> .....	64
I. Animales .....	64
I.1. Cepas y manipulación.....	64
I.2. Inoculación de virus. ....	65
I.3. Inducción de tumores .....	65
I.4. Extracción y conservación de las muestras .....	66
J. Explantes .....	67
J.1. Infección de los explantes .....	67
K. Métodos de análisis de las muestras .....	67
K.1 Western blot .....	67
K.2. Inmunofluorescencia .....	69
K.3. Marcaje metabólico con [ <sup>35</sup> S]Met/Cis .....	73
K.4. Northern Blot .....	74

K.5 Ensayos de Actividad luciferasa .....	76
K.6 Detección de apoptosis (TUNEL).....	77
K.7 Análisis informáticos .....	77
K.8 Análisis estadísticos .....	77
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>81</b>
A. REGULACIÓN DE LA TRADUCCIÓN DURANTE LA INFECCIÓN CON EL VIRUS SINDBIS .....	81
A1. Importancia de la estructura DLP en la replicación viral <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	81
A2. Generación de virus recombinantes con marcadores traduccionales .....	86
B. REGULACIÓN TRADUCCIONAL Y TROPISMO VIRAL IMPLICACIONES EN EL DESARROLLO DE VIRUS SINDBIS Y DERIVADOS CON ACTIVIDAD ONCOLÍTICA.....	98
B.1 Replicación del virus SV-WT y SV-ΔDLP en líneas celulares transformadas y de origen tumoral .....	100
B.2 Propiedades oncolíticas del virus AURA, un Alfavirus emparentado con Sindbis, con características similares al virus SV-ΔDLP.....	105
B.3 Actividad oncolítica de los virus SV salvaje, SV-ΔDLP y Aura sobre tumores inducidos en ratones SCID .....	108
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>115</b>
A. Respuesta antiviral y resistencia viral .....	115
B. La estructura DLP y la replicación de los Alfavirus .....	116
C. Marcadores traduccionales y <i>shut off in vivo</i> .....	118
D. Tropismo viral y oncolisis.....	122
E. Actividad oncolítica del virus SV ΔDLP .....	128
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>133</b>

<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>137</b>
---------------------------	------------

## **ANEXO**

1.- Inhibition of host translation by virus infection <i>in vivo</i> . Proc Natl Acad Sci U S A 107:9837-9842. (2010) .....	167
2.- Diversity in viral anti-PKR mechanisms. A remarkable case of evolutionary convergence. PloS ONE (submitted).....	175





## Abreviaturas

<b>A</b>	adenina	<b>min</b>	minuto
<b>ADN</b>	ácido desoxirribonucleico	<b>MOI</b>	multiplicidad de infección
<b>ARN</b>	ácido ribonucleico	<b>N</b>	normal
<b>ARNdc</b>	ácido ribonucleico de cadena doble	<b>n</b>	nano- ( $10^{-9}$ )
<b>ARNm</b>	ácido ribonucleico mensajero	<b>NCS</b>	<i>newborn Calf Serum</i> / Suero de ternera recién nacida
<b>ARNr</b>	ácido ribonucleico ribosomal	<b>NDV</b>	Virus de la Enfermedad de Newcastle
<b>ARNt</b>	ácido ribonucleico de transferencia	<b>nsp</b>	proteína no estructural
<b>AV</b>	adenovirus	<b>nt</b>	nucleótido
<b>b</b>	base	<b>nts</b>	nucleótidos
<b>BSA</b>	albúmina sérica bovina	<b>°C</b>	grado centígrado
<b>C</b>	citosina	<b>ORF</b>	<i>open Reading Frame</i> / Fase abierta de lectura
<b>CaMV</b>	Virus del Mosaico de la Coliflor	<b>p</b>	peso
<b>CBC</b>	<i>cap Binding Complex</i> /Complejo de unión a cap	<b>PABP</b>	<i>poly(A) Binding Protein</i> / Proteína de unión a poli(A)
<b>CDS</b>	<i>coding Sequence</i> / Región codificante	<b>PAGE</b>	electroforesis en gel de poli(acrilamida)
<b>Ci</b>	curio	<b>PAP</b>	poli A polimerasa
<b>Cis</b>	cisteína	<b>pb</b>	pares de bases
<b>cpm</b>	cuentas por minuto	<b>PBS</b>	tampón fosfato salino
<b>CrPV</b>	Virus de la Parálisis del Grillo	<b>PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa
<b>Da</b>	dalton	<b>PEG</b>	polietilenglicol
<b>DMEM</b>	medio Eagle modificado por Dulbecco	<b>pfu</b>	unidad formadora de placa
<b>DMSO</b>	dimetil sulfoxido	<b>PKR</b>	proteína quinasa activada por ARN de doble banda
<b>EBV</b>	virus de Epstein-Barr	<b>PRRs</b>	<i>patern Recognition Receptors</i> / Receptores de patrones patógenos
<b>ECL</b>	quimioluminiscencia mejorada	<b>PV</b>	Polio
<b>EDTA</b>	ácido etilendinitrilotetracético	<b>PVH</b>	Virus del papiloma humano
<b>EEEV</b>	Virus de la Encefalitis Equina del Este	<b>REO</b>	Reovirus
<b>eEF</b>	factor de elongación eucariota	<b>RNP</b>	ribonucleoproteína
<b>eIF</b>	factor de iniciación eucariota	<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>F</b>	faradio	<b>RRV</b>	Virus Ross River
<b>FCS</b>	<i>fetal Calf Serum</i> / Suero fetal de ternera	<b>RVFV</b>	Virus de la Fiebre del Valle del Rif
<b>FLU</b>	Virus de la Gripe	<b>S</b>	svedberg
<b>g</b>	gramo	<b>SARS</b>	Virus del Síndrome Respiratorio Severo
<b>G</b>	guanina	<b>SCID</b>	inmunodeficiencia combinada severa
<b>GAP</b>	<i>GTPase Activating Protein</i> / Proteína activadora de GTPasas	<b>SDS</b>	dodecil sulfato sódico
<b>GEF</b>	<i>GTP Exchange Factor</i> / Factor de intercambio de GTP	<b>SFV</b>	Virus del Bosque Semliki
<b>h</b>	hora	<b>SV</b>	Virus Sindbis
<b>HCV</b>	Virus de la Hepatitis C	<b>T</b>	timina
<b>HIV</b>	Virus de la Inmunodeficiencia Humana	<b>U</b>	uracilo
<b>hpe</b>	horas post-electroporación	<b>UPR</b>	<i>unfolded Protein Response</i> / Respuesta al desplegamiento de proteínas
<b>hpi</b>	horas post-infección	<b>UTR</b>	<i>untranslated Region</i> / Región no traducida
<b>HSV</b>	herpes simple	<b>UV</b>	ultravioleta
<b>IF</b>	inmunofluorescencia	<b>VV</b>	Virus Vaccinia
<b>IFN</b>	interferón	<b>μ</b>	micro- ( $10^{-6}$ )
<b>IREs</b>	<i>internal Ribosome Entry Site</i> / Sitio de Iniciación interno	<b>Ω</b>	ohmio
<b>J</b>	julios	<b>TE</b>	tris-EDTA
<b>kcal</b>	kilocaloría	<b>TNFα</b>	factor de necrosis tumoral alfa
<b>l</b>	litro	<b>U</b>	unidades
<b>LAMR</b>	receptor de laminina	<b>UV</b>	ultravioleta
<b>LB</b>	medio de Luria-Bertani	<b>VSV</b>	Virus de la Estomatitis Vesicular
<b>M</b>	molar	<b>WT</b>	virus salvaje, silvestre
<b>m</b>	metro		
<b>Met</b>	metionina		
<b>MHV</b>	Virus de la Hepatitis del Ratón		





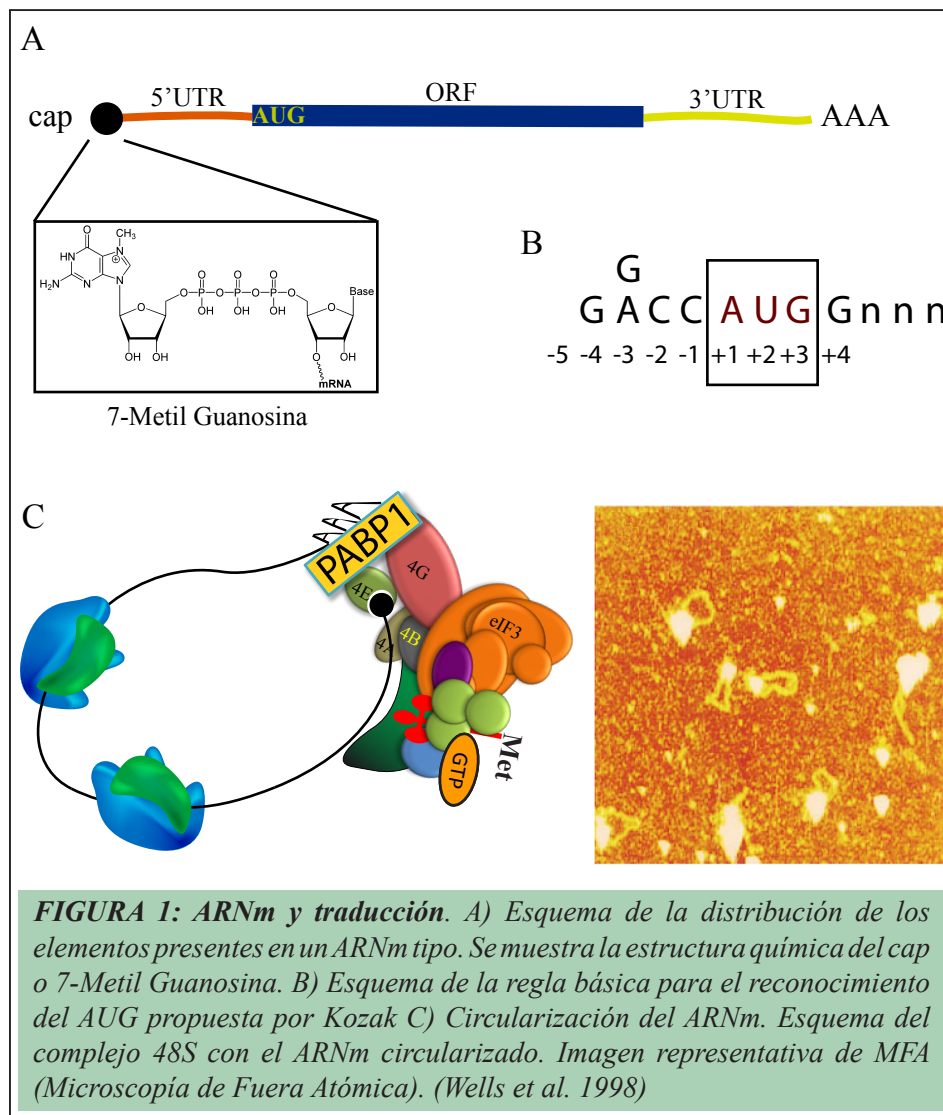
# INTRODUCCIÓN

La síntesis de proteínas o traducción ocupa un papel central en la expresión genética de la célula ya que permite convertir (traducir) la información contenida en los tripletes (codones) del ARNm en aminoácidos, dando lugar a una cadena polipeptídica o proteína. La traducción es uno de los procesos de mayor coste energético para la célula y su ritmo influye enormemente en la proliferación y en la diferenciación celular y tisular (Holland et al. 2004). La síntesis de proteínas ocurre exclusivamente en los ribosomas (citosólicos o asociados a retículo) que constituyen un complejo macromolecular con categoría de orgánulo. El ribosoma completo (80S) está formado por dos subunidades; la 40S compuesta por el ARNr 18S y la subunidad 60S formada por los ARNr 28S, 5S y 5,8S. Además, cada una de las subunidades están formadas por decenas de proteínas distintas, algunas de las cuales se encuentran asociadas de manera estable para formar el núcleo (core) estructural del ribosoma y de manera transitoria encargadas de regular la actividad del ribosoma durante las diferentes etapas de la síntesis de proteínas. La función del ribosoma va más allá de su papel puramente mecánico en la fabricación de proteínas, ya que asociada a esta actividad se encuentran otras como las que garantizan el correcto plegamiento y destino de las proteínas que se van sintetizando. La traducción se puede dividir en tres etapas básicas: iniciación, elongación

y terminación (Groppo et al. 2009, Hershey 1991, Jackson et al. 2010). El ribosoma completo 80S es el único competente en elongación, mientras que la etapa de reclutamiento del ARNm e iniciación la lleva a cabo la subunidad 40S.

### ***A. ELEMENTOS DEL ARNm***

En términos generales, los ARNm eucarióticos se pueden dividir en tres regiones básicas (**Fig. 1 A**): la región codificante (CDS) y las regiones no traducidas 5' y 3' (UTRs). La longitud promedio del 5'UTR es de 60 nts, aunque en algunos ARNm sometidos a estricto control traduccional pueden ser superiores a los 2000 nts de longitud (Pickering et al. 2005, Yang et al. 2010). La región 3'UTR suele ser más larga y de un mayor contenido en A+T que la región 5'UTR. Además, la región 3'UTR de los ARNm suele albergar los sitios de unión de los microARN que atenúan la traducción de los ARNm de mamíferos mediante silenciamiento (Ha et al. 1996, Lai 2002). La gran mayoría de las moléculas de ARNm se encuentran flanqueadas en sus extremos 5' y 3' por las estructuras cap y la cola de poli(A) respectivamente, que en términos generales confieren estabilidad y mejoran la traducción de los ARNm (Bernstein et al. 1989, Filipowicz 1978, Furuichi et al. 1977, Gallie 1991). La estructura cap consta, en su forma más común, de una guanosina metilada en posición 7 (7-metil G) unida por un puente trifosfato 5'-5' al siguiente nucleótido (Shatkin 1976). El cap es añadido durante las primeras etapas de la síntesis de ARN y permite el anclaje inicial del complejo nuclear de unión a cap (CBC) que favorece el tránsito de los ARNm desde el núcleo al citoplasma, para servir posteriormente de anclaje del complejo de iniciación 4F implicado directamente en el reclutamiento de los ARNm a los ribosomas (Gingras et al. 1999). La cola de poli (A) se añade en el extremo 3' de los ARNm



por la acción de la poli (A) polimerasa (PAP) antes de que los ARNm se exporten al citoplasma para su traducción (August et al. 1962, Colgan et al. 1997, Hall 2002). Su longitud promedio es de unos 150 nts, aunque en algunos ARNm virales alcanza los 300 nts de longitud. El alargamiento (o acortamiento) de la cola de poli (A) del ARNm suele estar asociado a un incremento (o inhibición) de su traducción, y algunos ARNm implicados en procesos de espermatogénesis y maduración de oocitos se regulan de este

modo (Richter 1999). Por separado, pero sobretodo de manera conjunta, el cap y la cola de poli (A) incrementan enormemente la traducción de los ARNm *in vivo*, de modo que la eliminación de uno de ellos o de ambos reducen casi completamente la traducción de ARNm marcadores cuando se transfectan directamente en células en cultivo (Peng et al. 2008). Este sinergismo funcional se pudo entender a nivel estructural a finales de los 90, cuando se demostró mediante microscopía electrónica la existencia de una topología cerrada de los ARNm durante su traducción, de modo que los extremos 5' y 3' están conectados (**Fig. 1 C**) por la interacción de los factores de iniciación 4F y PABP que reconocen el extremo cap y la cola de poli (A) respectivamente (Christensen et al. 1987, Imataka et al. 1997, Le et al. 1997, Tarun et al. 1996, Wells et al. 1998). Hasta la fecha, en un reducido grupo de ARNm celulares y en algunos virales, se ha demostrado la existencia de regiones altamente estructuradas que permiten la unión de los ribosomas de un modo independiente del extremo 5' cap. Estas estructuras denominadas IRES han sido ampliamente estudiadas en algunos ARNm virales como el de Poliovirus, HCV y el CrPV ya que confieren ciertas características traduccionales a estos ARNm tales como un menor requerimiento de factores de iniciación (Lytle et al. 2002, Pestova et al. 2004, Schmid et al. 1994). Exceptuando contadas ocasiones, los ARNm emplean un único AUG como codón de iniciación. Las reglas básicas para el reconocimiento del AUG iniciador fueron establecidas por Kozak hace 20 años y se cree que la mayoría de los ARNm siguen esta regla básica (Kozak 1987). Lo que determina que un AUG sea reconocido como codón de iniciación, a parte de su proximidad al extremo 5' del ARNm, es el contexto o secuencia que lo rodea. Una purina (G o A) en posición -3 es importante para este reconocimiento, mientras que la posición +4 tiene una menor influencia en este proceso (Xia 2007) (**Fig. 1 B**). Además, y como regla general, el primer AUG en contexto que el ribosoma encuentra

durante su movimiento de rastreo desde el 5' del ARNm suele ser el usado como codón de iniciación, aunque existen importantes excepciones a esta regla como muchos ARNm con estructuras IRES o con ORFs cortas que regulan la eficiencia de traducción (Dever 2002, Jackson et al. 2010, Wek et al. 2006). Resultados recientes han demostrado que la región codificante puede influir significativamente en la velocidad de traducción de los ARNm. La composición y frecuencia de tripletes en esta región regula la velocidad de elongación a lo largo de los ARNm, de manera que ésta se ralentiza al comienzo de la región codificante y se acelera al final de la misma (Cannarozzi et al. 2010, Tuller et al. 2010). Por último, la región 3'UTR de los ARNm suele presentar (como promedio) un mayor tamaño que la región 5'UTR y un mayor contenido en A+T, lo que se asocia con una menor estructura secundaria (Kertesz et al. 2010). La región 3'UTR pueden alojar importantes elementos de regulación que modulan la traducción de ciertos ARNm durante el desarrollo embrionario, sobre todo promoviendo el silenciamiento traduccional (Ha et al. 1996). Además, la mayor parte de los sitios de unión de los microARNs que se cree que pueden estar modulando la traducción del 40% de todos los ARNm, se localizan en las regiones 3'UTR de los ARNm (Maziere et al. 2007, Orom et al. 2010, Rane et al. 2007).

## ***B. LA ESTRUCTURA SECUNDARIA Y TERCARIA DEL ARNm***

Los ARN raramente adoptan una conformación lineal y tienden a formar estructuras secundarias y terciarias que pueden alcanzar un alto grado de complejidad (Watts et al. 2009). Dado que los apareamientos para formar una doble hélice siempre ocurren siguiendo direcciones antiparalelas, las horquillas o *hairpin loops* constituyen uno de los elementos

básicos de estructura secundaria de ARN (Chen 2008). La estabilidad de las horquillas viene determinada por la longitud y tipo de apareamientos (G:C o A:T) de la hélice (*stack*) y el tamaño de las regiones desapareadas (bucles externos, internos y burbujas). Otro elemento importante de estructura secundaria aunque menos frecuente son los *pseudoknots*, estructuras algo más complejas en donde las hélices se forman por apilamiento de dos regiones no inmediatamente consecutivas, dejando en el tipo más frecuente de *pseudoknot* (H) dos *loops* flanqueando la región de doble hélice. Dos o más horquillas de ARN pueden organizarse en estructuras de tipo trébol o cruz que en ocasiones se combinan con *pseudoknots* para dar lugar a plegamientos del tipo ARNt, las moléculas de ARN mejor conocidas desde el punto de vista estructural y funcional (Clark 2006). Regiones distantes dentro de la misma molécula de ARN pueden agregarse para conformar la estructura terciaria del ARN, que en combinación con proteínas constituyen probablemente el estado real de los ARNm en la célula (complejos de ribonucleoproteína o RNPs). Un ejemplo de este nivel superior de plegamiento es la recircularización de los ARNm vía interacción del extremo 5' (cap) con la región 3' (poli (A)) promovido por algunos factores durante la iniciación de la síntesis de proteínas (Le et al. 1997).

La resolución de la estructura de los ARNm ha estado enormemente limitada por la naturaleza no rígida (dinámica) de sus plegamientos, lo que ha imposibilitado la obtención de cristales para su posterior difracción por rayos X. Los conocimientos básicos que hoy tenemos sobre estructura secundaria de ARN han venido de combinar predicciones de plegamiento obtenidos mediante programas de computación con datos experimentales de modificación química y enzimática de los ARN. Existen básicamente tres métodos básicos de predicción de estructura secundaria del ARN: 1. Métodos basados únicamente en el principio termodinámico

de minimización de la energía libre del plegamiento, lo que genera una estructura óptima y varias subóptimas (MFold). 2. Métodos probabilísticos basados en una función de partición que genera una estructura promedio (centroide). 3. Un método reciente que infiere la estructura secundaria y terciaria a partir de los datos de secuencia y está basado en los motivos de nucleótidos cíclicos.

En términos generales, el grado de acierto de estos programas de predicción está entre el 50-70% (Mathews 2006).

Dado que los motivos estructurales de los ARNs determinan en buena medida la función biológica de estas moléculas, la estructura secundaria de los ARNm pueden ejercer una enorme influencia sobre su ritmo de traducción. Podemos distinguir entre dos tipos básicos de regulación: la que ejercen las regiones 5' y 3' no traducidas (UTR) y que afectan básicamente a la iniciación de la traducción, y la que ejercen los elementos de tipo *hairpin* y *pseudoknot* dentro de la región codificante de los ARNm y que pueden afectar al reconocimiento del AUG iniciador o a la fase de lectura que el ribosoma lee durante la elongación. Dado que la capacidad de despegamiento de ARN que presenta la subunidad 40S es limitada, la presencia de elementos de estructura secundaria en las regiones 5'UTR de los ARNm suelen bloquear o ralentizar el rastreo o *scanning* que los complejos de iniciación 48S llevan a cabo en busca del codón de iniciación (AUG). A los complejos de iniciación 48S suelen asociarse factores con actividad helicasa como eIF4A y DHX29 que incrementan la capacidad de los complejos de iniciación de fundir la estructura secundaria del ARNm durante su movimiento (Pisareva et al. 2008). A pesar de estas actividades, la introducción artificial de un *hairpin loop* de estabilidad superior a -30kcal/mol bloquea casi completamente la iniciación de la traducción de ese ARNm *in vitro* y en cultivos celulares (Kozak 1988, Kozak 1991, Pelletier et al. 1985, Pestova et al. 2002). La situación de los

elementos de estructura secundaria dentro de la región 5'UTR también determina en buena medida el efecto neto sobre la iniciación de la traducción. Así, la presencia de estructura de ARN en el inicio o en el medio de la región 5'UTR suelen tener un efecto inhibitorio fuerte sobre la iniciación, especialmente cuando la estructura de ARN está muy próxima al 5'cap. Sin embargo, la presencia de *hairpin loop* inmediatamente antes del AUG o cuando éste está incluido en dicha estructura, tiene un efecto inhibitorio, incluso puede ser que favorezca el reconocimiento de un segundo codón de iniciación aunque éste no presente un buen contexto (Kozak 1990).

Según los conocimientos acumulados hasta la fecha, la presencia de elementos de estructura secundaria dentro de la región codificante pueden afectar a la síntesis de proteínas de dos maneras. La presencia de *stem loops* de alta estabilidad por detrás del AUG iniciador en los ARNm de ciertos virus (Alfavirus) permite el posicionamiento de la subunidad 40S sobre el AUG iniciador (Toribio et al. 2010, Ventoso et al. 2006). En otros ARNm virales como los de Bromovirus, Retrovirus y los propios Alfavirus, la presencia de estructuras de tipo *pseudoknot* pueden promover el cambio en la fase de lectura de los ribosomas en un porcentaje considerable (5-15%), lo que genera la aparición de una nueva secuencia polipeptídica (Giedroc et al. 2009, Namy et al. 2006). Sin embargo, la inesperada cantidad de estructura secundaria de ARN descubierta recientemente en los ARNm de levaduras mediante técnicas de secuenciación masiva (RNAseq) probablemente revelará la existencia de mecanismos de regulación adicionales en las regiones codificantes de los ARNm (Kertesz et al. 2010).

### ***C. INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN***

La etapa de iniciación consiste en posicionar el primer aminoacil-ARNt (*Met-tRNAi*) sobre el AUG iniciador para comenzar la elongación



de la cadena polipeptídica. Para ello, el ARNm debe reclutar la subunidad ribosómica 40S y posicionarla sobre el codón de iniciación. En este proceso están implicados al menos 13 factores solubles denominados factores eucarióticos iniciación (eIFs) que interaccionan y se disocian del ribosoma de manera cíclica y ordenada (Hershey 1991, Jackson et al. 2010). La coordinación y cooperatividad en la unión (y disociación) de estos factores a los ribosomas hace que estos puedan reclutar los ARNm y reconocer el codón de iniciación con una altísima fiabilidad. El proceso de iniciación (**Fig. 2**) se puede dividir a su vez en tres etapas fundamentales que suceden de modo consecutivo pero que están muy acopladas entre sí.

- 1) Reclutamiento de la subunidad 40S cargada con el *Met-tRNA<sub>i</sub>*, en la que están implicados los factores eIF2, eIF1/1A y eIF3 además del complejo 4F (eIF4E, eIF4G y eIF4A/4B).
- 2) Rastreo o *scanning* del ribosoma a lo largo de la región 5'UTR para encontrar el AUG iniciador, en el que están implicados directamente los factores eIF1, eIF1A y eIF2, eIF4A/4B y quizás DHX29.
- 3) Posicionamiento del complejo sobre el codón de iniciación, apareamiento codón-anticodón con el *Met-tRNA<sub>i</sub>* y entrada de la subunidad 60S para formar el ribosoma 80S competente en elongación.

En este proceso están implicados directamente los factores eIF2, eIF5 y eIF5B. La unión de alguno de estos factores como el eIF3 es esencial para la unión posterior del complejo 4F o del factor eIF2, mientras que el factor eIF5 promueve en gran medida la unión de los factores eIF1 y eIF1A al ribosoma.

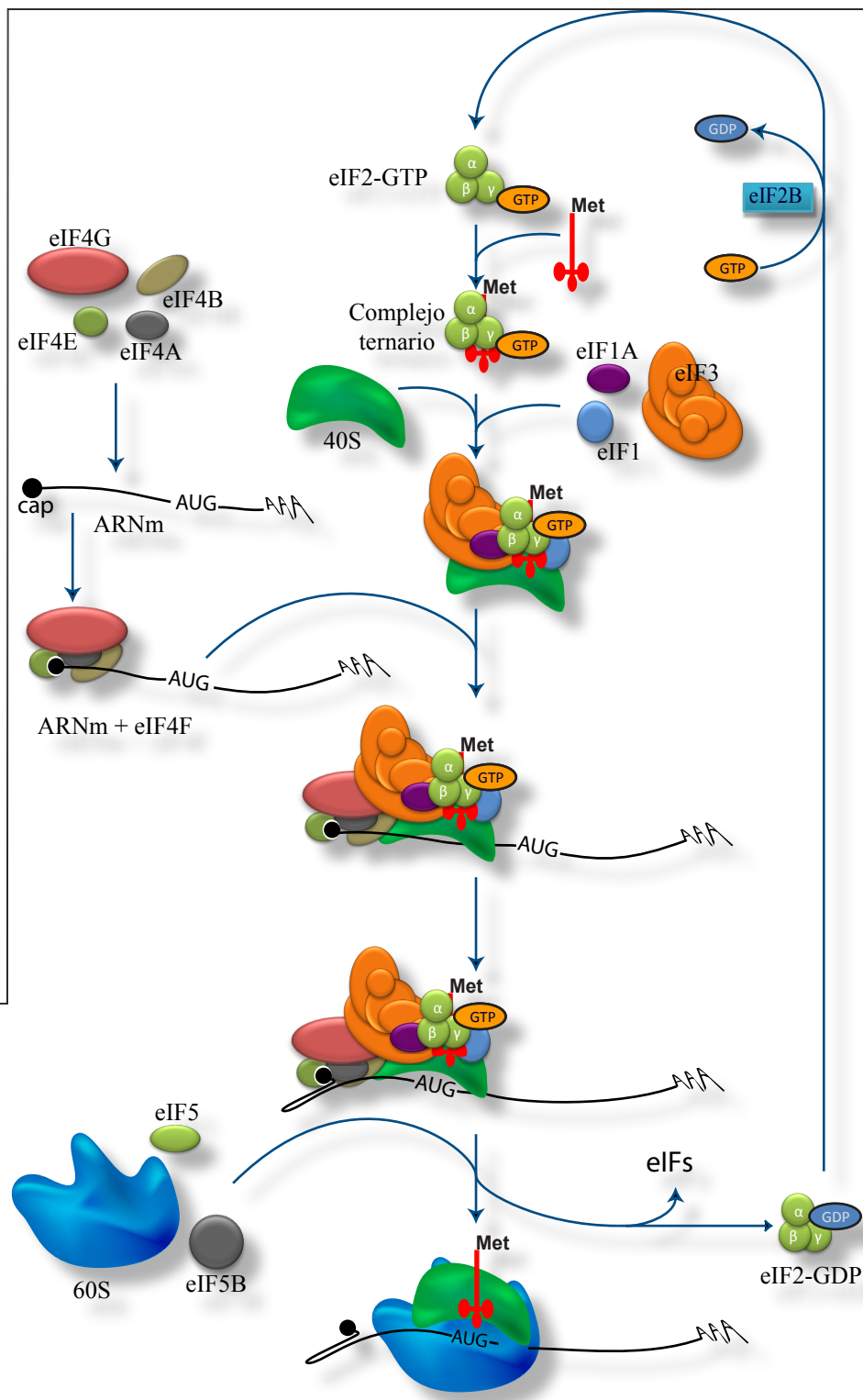
### ***1. Reclutamiento de los ribosomas al ARNm.***

Constituye la etapa limitante del proceso de iniciación, ya que determina directamente la velocidad con la que un ARNm se traduce en un momento determinado. La unión de la subunidad ribosomal 40S al ARNm se encuentra limitada por la estructura secundaria de la región 5'UTR, que

afecta directamente a la accesibilidad del ribosoma (Kozak 1988, Kozak 1991). En términos generales, los ARNm con más estructura secundaria en su región 5'UTR se traducen de modo menos eficiente que los ARNm con regiones 5'UTR cortas y poco estructuradas. Además, el reclutamiento del ribosoma por los ARNm con estructura secundaria en el 5'UTR depende en gran medida de la disponibilidad y actividad de los factores del complejo 4F (4E, 4G, 4A/4B) que colectivamente reconocen la estructura cap de los ARNm y promueven su unión al ribosoma a través de la interacción con el factor eIF3. El factor eIF4E es la proteína que lleva a cabo la unión directa al cap de los ARNm y su actividad se regula por fosforilación y por su unión a proteínas inhibitoras denominadas 4E-BPs (Lawrence et al. 1997, Ptushkina et al. 1999). El factor eIF4G es una proteína de andamiaje, capaz de unir simultáneamente eIF4E, eIF4A, PABP y eIF3. La actividad del factor eIF4G se regula por fosforilación y proteólisis. La actividad de los factores eIF4E y 4G se regula fisiológicamente en respuesta a señales mitogénicas que promueven proliferación o crecimiento celular, de modo que su actividad y la consiguiente velocidad de traducción de la célula se incrementan en respuesta a insulina y otros factores de crecimiento (Miron et al. 2003, Pause et al. 1994, Proud 2006)

En algunos ARNm virales y celulares existen estructuras especiales

**FIGURA 2: Iniciación de la traducción cap dependiente.** La iniciación comienza con la formación del complejo 43Són del complejo ternario con los factores eIF1A, eIF1 y eIF3 a la subunidad ribosomal 40S. Seguidamente el complejo de preiniciación 43S recluta el ARNm a través del complejo eIF4F (eIF4E, eIF4G, eIF4A y eIF4B). Posteriormente se produce un barrido hasta la localización del AUG iniciador momento en el cual se produce el reconocimiento de este por el factor eIF2 y la posterior liberación de los factores de iniciación asociados. La unión de la subunidad ribosomal 60S tiene lugar y da comienzo la fase de elongación. (Adaptado de Dever et al. 2002)



denominadas IRES que promueven la unión interna del ribosoma 40S de un modo independiente del extremo 5' cap del ARNm (Kieft 2008, Pelletier et al. 1988). En términos generales, la iniciación de la traducción promovida por IRES es independiente de la actividad de unión a cap (eIF4E) y en algunos casos especiales como el IRES del ARNm de HCV, sólo requiere de la participación de los factores eIF3 y eIF2. Otros IRES virales como el de los picornavirus, sin embargo, requieren la participación de más factores canónicos de iniciación como el eIF4A/4B y parte de la actividad de eIF4G (Jackson et al. 2010, Pestova et al. 1996, Schneider et al. 2003).

Por último, un mecanismo novedoso dependiente de cap se encuentra presente en ciertos ARNm virales como los tardíos de Adenovirus, el gen Y de Sendai, ciertos genes de Papilomavirus o el ARN 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) exhiben una versión particular de rastreo denominada *shunting*. En este tipo de iniciación, el ribosoma se une al ARNm a través del cap para luego “saltar” hasta el codón de iniciación sin llevar a cabo el clásico rastreo. Hasta la fecha se desconocen los detalles moleculares de este proceso aunque sí parece requerir la presencia de una secuencia/estructura específica en el ARNm. (Yueh et al. 2000).

## **2. Rastreo o scanning en busca del codón de iniciación**

Lo lleva a cabo el ribosoma competente en *scanning* y requiere la acción directa de los factores eIF4A/4B, eIF1 y eIF1A. El factor 4A es una helicasa de ARN de la familia DEAD que funde las regiones de doble cadena de ARN con la consiguiente hidrólisis de ATP (Rogers et al. 2002, Rogers, Lima et al. 2001). En este proceso colabora el factor 4B que también exhibe la capacidad de unir ARN (Rogers, Richter et al. 2001). Los factores eIF1 y eIF1A se unen al ribosoma 40S y lo mantienen en un estado “abierto” competente en *scanning*, además de conferir especificidad en el reconocimiento del AUG iniciador correcto. El movimiento de rastreo

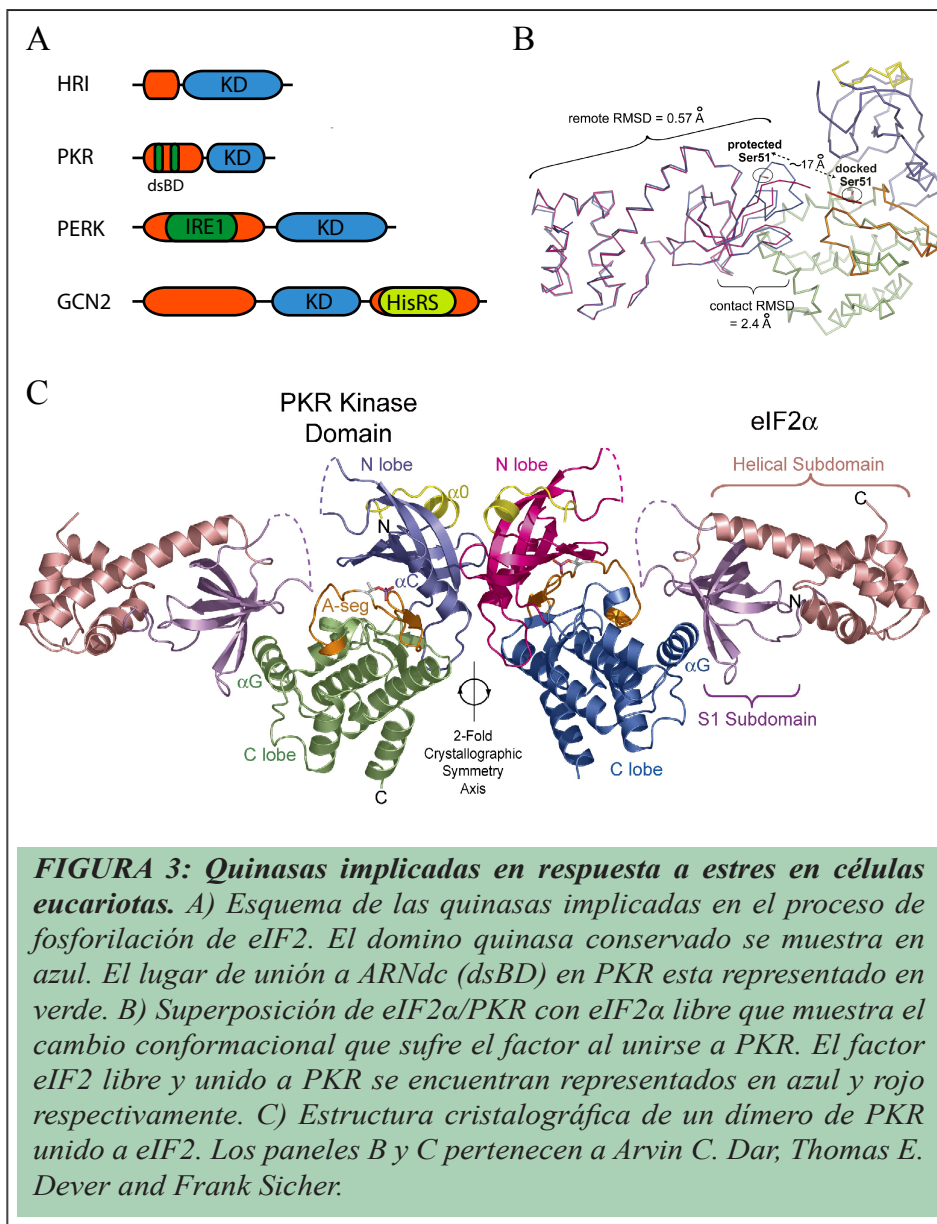
o *scanning* constituye el paso de mayor consumo energético durante la iniciación de la traducción. Durante este proceso, la estructura secundaria del ARNm vuelve a jugar un papel importante, ya que la presencia de elementos de estructura estables en el ARNm pueden provocar la interrupción del *scanning* y la posterior disociación del ribosoma 40S. Recientemente se ha descrito la existencia de otra helicasa de ARN implicada en el proceso de iniciación, aunque su relevancia biológica en la célula está todavía por demostrar (Parsyan et al. 2009, Stevenson et al. 2008).

### **3. Introducción del *Met-tRNAi***

En este proceso está implicado directamente el factor eIF2 unido al *Met-tRNAi* y al ribosoma 40S, y constituye una de las etapas de la traducción sometida a mayor nivel de regulación. El factor eIF2 es un heterotrímero formado por las subunidades  $\alpha\beta\gamma$  capaz de unir específicamente *Met-tRNAi* en presencia de GTP para dar lugar al complejo ternario (Kimball 1999). Este complejo se asocia a la subunidad 40S y adquiere de esta manera la capacidad de localizar el AUG. El apareamiento codón-anticodón entre el *Met-tRNAi* y el AUG iniciador en el sitio P del ribosoma dispara una serie de cambios en el complejo de iniciación que promueve la salida de los eIFs y la entrada de la subunidad 60S para iniciar la elongación de la cadena polipeptídica. En este proceso está directamente implicado el factor eIF5B y requiere la hidrólisis de GTP (Acker et al. 2009).

### **D. eIF2 Y SUS QUINASAS**

La actividad del factor eIF2 determina directamente la velocidad de iniciación de la traducción, por lo que constituye el punto de regulación más importante en eucariotas (Dever 2002, Wek et al. 2006). La subunidad  $\gamma$  de eIF2 es la directamente involucrada en el reconocimiento específico

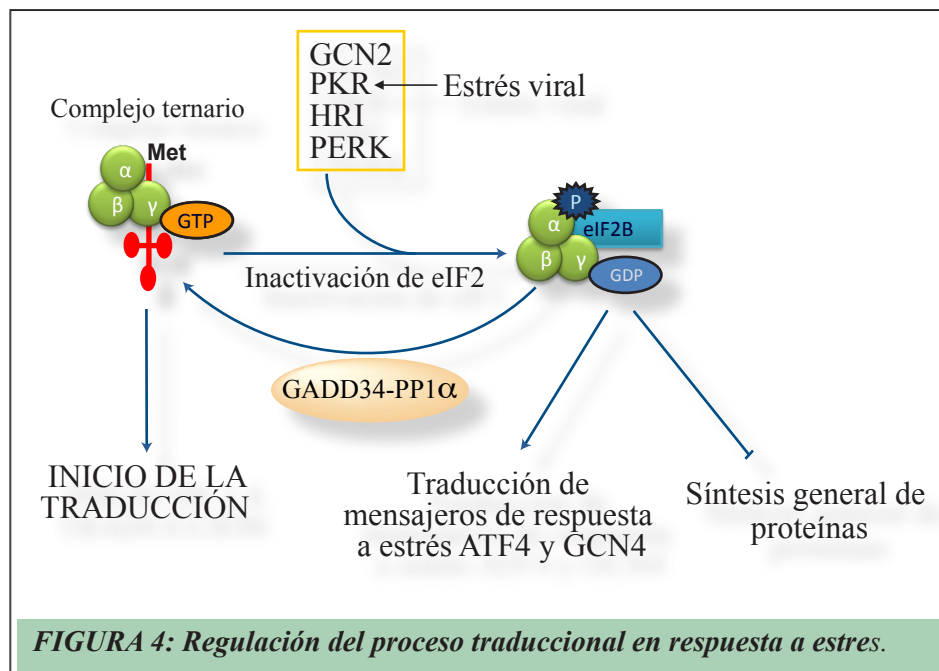


y la unión estable del *Met-tRNA<sub>i</sub>*, proceso que requiere la unión previa de GTP para formar el complejo ternario que se asocia al ribosoma 40S de manera estable (Kimball 1999). La subunidad α tiene un papel regulador y porta el sitio fundamental de regulación de la actividad del factor; la serina en posición 51 la cual es susceptible de sufrir procesos de fosforilación.

El factor eIF2 exhibe actividad GTPasa, de manera que cuando el *Met-tRNAi* localizado en el sitio P del ribosoma se aparea con el codón de iniciación, el eIF2 hidroliza el GTP dando lugar a una molécula de GDP la cual queda unida al factor. Sin embargo, al igual que ocurre con otras GTPasas celulares, la actividad GTPasa propia de eIF2 es muy baja y requiere la participación de otro factor de la familia de las GAP (*GTPase activating protein*) denominado factor de iniciación eIF5. En presencia de este factor, eIF2 promueve la hidrólisis eficiente de GTP y permite la posterior entrada de la subunidad 60S para formar el complejo de elongación 80S.

En condiciones óptimas de traducción, la célula está reciclando continuamente la actividad del eIF2 mediante el intercambio de GDP por GTP. Este proceso está promovido por el factor de iniciación eIF2B, un complejo con actividad intercambiadora de GTP (GEF, *GTP Exchange Factor*) (Mohammad-Qureshi et al. 2008). Los niveles y actividad de eIF2B están también sometidos a una estricta regulación y su alteración está directamente implicada en algunas enfermedades neurodegenerativas como la ataxia infantil con hipomielinización del SNC y la leucoencefalopatía con sustancia blanca evanescente (Leegwater et al. 2001, Richardson et al. 2004).

En mamíferos existen cuatro quinasas específicas de eIF2 (**Fig. 3A**) que fosforilan el factor en el residuo Ser 51 de la subunidad  $\alpha$  en respuesta a diversos tipos de estrés (Dever 2002, Wek et al. 2006). Todas estas proteínas presentan un dominio eIF2 quinasa muy conservado que reconoce eIF2 con un altísimo grado de especificidad, de modo que se cree que su función se limita únicamente a regular la actividad de eIF2 mediante fosforilación (Dar et al. 2005, Dever 2002) (**Fig 3 A B**) Cada quinasa tiene dominios específicos que le permiten activarse en respuesta a un tipo particular de estrés. Así, la quinasa GCN2 contiene un motivo de unión a ARNt no cargados (sin aminoacilar) que permiten a la quinasa activarse



en respuesta a la deprivación nutricional que conlleva una bajada en el aporte de aminoácidos a la célula (Berlanga et al. 1999). Datos recientes indican que esta quinasa responde también a radiación UV y a la infección de ciertos virus ARN (Berlanga et al. 2006, Deng et al. 2002). La quinasa PERK contiene un dominio de retención en el retículo endoplásmico que le permite responder frente al estrés en este compartimento (Harding et al. 1999). La alteración funcional del retículo endoplásmico interrumpe la maduración de proteínas a través de la ruta secretora, lo que promueve el desplegamiento parcial de proteínas y activa la respuesta UPR (*unfolded protein response*) a través de, entre otras, la activación de PERK (Fels et al. 2006, Liu et al. 2003, Ron 2002, Wek et al. 2007). La quinasa HRI contiene un dominio de unión a grupo hemo, de modo que responde a la deficiencia de hemina. Su función parece estar restringida a células de la línea eritroide (glóbulos rojos) de modo que esta quinasa regula directamente la velocidad de síntesis de globina (Crosby et al. 1994). Por último, la quinasa PKR se encuentra solamente en vertebrados y contiene



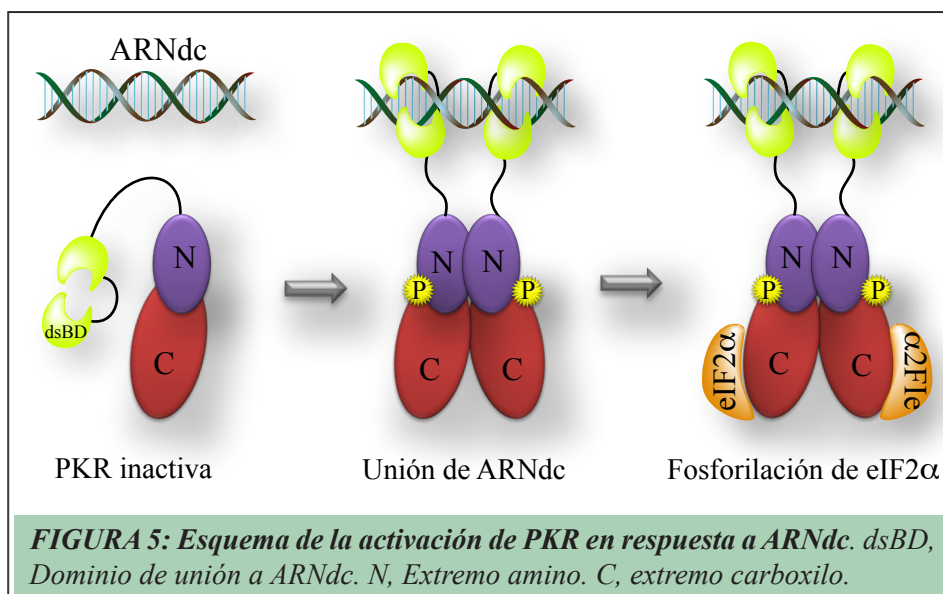
un motivo de unión a ARN de cadena doble lo que le permite detectar la acumulación de ARN virales, por lo que desempeña una función antiviral (Clemens et al. 1997, Garcia et al. 2006, Patel et al. 1992).

La fosforilación de eIF2 provoca un bloqueo casi instantáneo de la síntesis de proteínas y la activación de la respuesta celular frente al estrés. La fosforilación de eIF2 en la Serina 51 de la subunidad  $\alpha$  incrementa enormemente su afinidad por eIF2B, de modo que ambos factores forman complejos estables no productivos (Sudhakar et al. 2000) (**Fig. 4**). Una fracción pequeña de eIF2 fosforilado puede secuestrar casi todo el eIF2B de la célula e impedir su función como intercambiador de GTP, hecho que explica el desproporcionado efecto que sobre la traducción tiene la fosforilación de eIF2, aunque sólo afecte a una proporción pequeña del factor.

La célula también ejerce un control estricto sobre la defosforilación de eIF2 y la fosfatasa PP1 $\alpha$  parece ejercer un papel central en este proceso. La proteína PP1 $\alpha$  es un complejo que ve como su actividad fosfatasa se estimula en las etapas tardías de la respuesta al estrés, cuando es necesario recuperar los niveles iniciales de traducción para mantener la viabilidad celular. En este proceso está directamente implicado el factor GADD34, cuyos niveles aumentan en las etapas tardías de la respuesta al estrés y que se asocia a PP1 $\alpha$  para promover el reclutamiento de eIF2 y su defosforilación (Kojima et al. 2003, Paschen et al. 2004) (**Fig. 4**).

### ***E. PKR Y LA RESPUESTA ANTIVIRAL***

La quinasa PKR (*dsRNA activate eIF2 kinase*) es una proteína de 68 kDa codificada por un gen que sólo está presente en vertebrados. Pertenece a un grupo de sensores antimicrobianos de mamíferos agrupados bajo el nombre de *pattern-recognition receptors* (PRRs), entre los que se



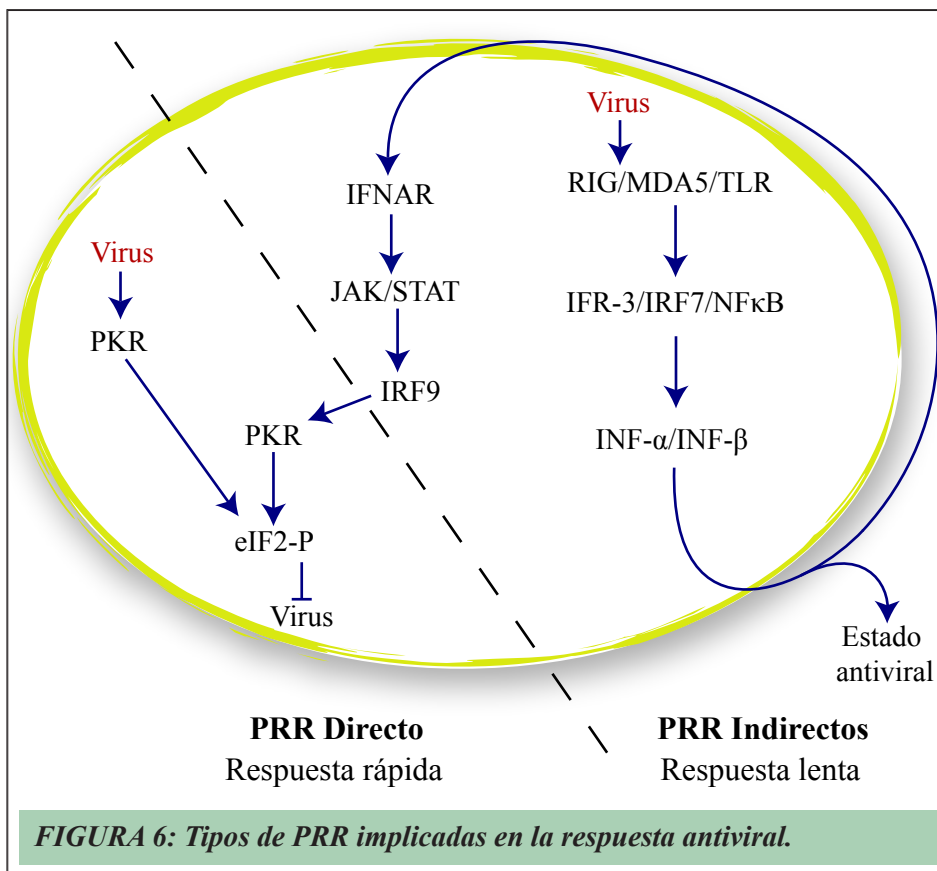
inluyen los genes *RIG-I*, *DAI* y los *Toll-like receptors* (*TRLs*), todos ellos con importantes funciones antivirales (Kawai et al. 2009). El mecanismo enzimático de activación de PKR está bien definido y depende de su capacidad de dimerización y autofosforilación (**Fig. 5**). La dimerización de dos moléculas de quinasa ocurre cuando los dominios dsRBD unen una molécula de ARN de doble cadena de longitud suficiente, proceso que induce un cambio conformacional que permite la dimerización de la quinasa. Se requiere una longitud mínima de 35-40 nts de ARN de doble banda para que la quinasa se active, lo que explica el hecho de que los ARN silenciadores (siARNs y microARNs) de 21 nts no actúen como activadores de PKR. Estudios cristalográficos recientes han relevado el alto grado de especificidad de PKR, y por extrapolación del resto de las eIF2 quinasas, por eIF2 (**Fig. 3 C**). El reconocimiento inicial del subdominio S1 de eIF2α promueve un cambio conformacional en esta región que aproxima la Ser51 fosforilable al centro catalítico de PKR (Dar et al. 2005, Dey et al. 2005, Taylor et al. 2005) (**Fig. 3 B**).

La capacidad de PKR de unir moléculas de doble banda de PKR

permite a la célula detectar infecciones virales, ya que los virus ARN suelen generar formas replicativas de ARN como subproductos de la replicación viral. Ciertos virus ADN como Poxvirus y HSV-1 también generan formas de ARN de doble banda debido a la transcripción antiparalela que ocurre en ciertas ORFs del genoma de estos virus (Jacquemont et al. 1975). La activación de PKR en respuesta a la infección viral promueve la fosforilación de eIF2 $\alpha$  en un intento de la célula de bloquear la traducción de los ARNm virales. El importante papel que PKR juega en la repuesta antiviral de los mamíferos queda ilustrado por tres observaciones. 1) La eliminación del gen *pkr* en ratones aumenta la sensibilidad a ciertos virus ARN y ADN (Balachandran et al. 2000, Stojdl et al. 2000, Yang et al. 1995) 2) La mayor parte de los virus estudiados hasta la fecha expresan productos (proteínas o ARN) que previenen o neutralizan la activación de PKR en células infectadas (Langland et al. 2006, Garcia et al. 2006). 3) Datos recientes han revelado que los genes *Pkr* de mamíferos han experimentado intensos episodios de evolución positiva durante los últimos 50 millones de años, dirigidos por procesos de evolución antagónica entre PKR y los inhibidores de algunos virus (Rothenburg et al. 2009).

El gen *pkr* se expresa de manera ubicua en muchos tejidos, aunque a niveles bajos. Su expresión aumenta tras el tratamiento con IFN $\alpha/\beta$ , y en menor grado con el IFN $\gamma$  (Samuel et al. 1997, Taga et al. 1999). Numerosos estudios demuestran que PKR es uno de los efectores importantes de los IFNs, aunque no el único (Haller et al. 2007, Silverman 2007). De modo que PKR puede ejercer su acción antiviral en dos ámbitos: un efecto directo y rápido en la célula infectada, y como efector del IFN que protegería a las otras células creando en ellas un estado antiviral (**Fig. 6**). Los datos experimentales en animales apuntan a la existencia de estos dos ámbitos de acción de PKR (Barry et al. 2009).

Uno de los aspectos más interesantes en la interacción virus-célula



son los mecanismos que la mayoría de los virus han desarrollado para bloquear o neutralizar la activación de PKR en las células infectadas. La estrategia más extendida es la expresión de productos (generalmente proteínas, pero también ARNs) que bloquean la activación de PKR, bien compitiendo por la unión con su activador natural (ARN de doble cadena) o bien interaccionando directamente con PKR e impidiendo su activación (Garcia et al. 2006). Algunos ejemplos de estos inhibidores virales son las proteínas E3 del virus Vaccinia, NS1 de Influenza o NSP5A de HCV (*ver tabla 1*). Algunos de estos productos virales unen ARN de doble banda e interaccionan directamente con PKR, de modo que bloquean la activación de PKR a dos niveles. En otros casos como Adenovirus, la

expresión de pequeñas moléculas de ARN (VAI) unen PKR de un modo inhibitorio e impiden su activación en las células infectadas (Bergmann et al. 2000, Gerotto et al. 2000, Ghadge et al. 1994, Romano et al. 1998). Otra estrategia viral consiste en expresar proteínas que mimetizan los sitios de reconocimiento presentes en eIF2 y actúan como pseudosustratos de PKR, como en el caso de los genes K3L de poxvirus (Langland et al. 2002). Ciertos virus como Polio o Rift valley inducen la degradación de PKR en células infectadas a través de un mecanismo que todavía se desconoce (Black et al. 1993, Ikegami et al. 2009). Otra estrategia viral consiste en estimular la defosforilación de eIF2 en células infectadas. Es el caso de HSV-1, y probablemente de otros virus ADN complejos, que permiten una cierta activación de PKR que rápidamente se neutraliza por el efecto del producto viral  $\gamma 1$  34.5. Se trata de un gen con un dominio similar a GADD34 que recluta la fosfatasa PP1 $\alpha$  para promover la defosforilación de eIF2 en las células infectadas con HSV-1 (He et al. 1998, Verpooten et al. 2009). Una de las últimas estrategias virales descritas para contrarrestar el efecto de PKR consiste en permitir su activación en las células infectadas, a cambio de que los ARNm virales hayan adquirido la capacidad de iniciar la traducción de un modo independiente de eIF2. Es el caso de los Alfavirus (Sindbis), que permiten una fuerte activación de PKR en las células infectadas y una completa fosforilación de eIF2. Los ARNm virales 26S son capaces de iniciar la traducción gracias a la presencia de una estructura de ARN (DLP) situada por detrás del AUG iniciador que posiciona el ribosoma 40S sobre el sitio correcto, obviando de esta manera la participación de eIF2 (Toribio et al. 2010, Ventoso et al. 2006). Una resistencia similar a la fosforilación de eIF2 ha sido descrita recientemente para los ARNm de HCV, aunque la existencia de una estructura DLP equivalente en el ARNm viral está por demostrar (Toroney et al. 2010). En ausencia de un eIF2 funcional en

Mecanismo	Virus	Producto Viral
Secuestro de ARNdc	VV	E3L
	HSV-1	Us11
	REO	$\sigma 3$ , $\sigma 4$
	FLU	NS1
Interacción con PKR	AV	VAI ARN
	EBV	EBER ARN
	HSK	LANA2
	VV	K3L, E3L
	HSV-1	Us11
	FLU	NS1
Competidores de PKR	HCV	E2
	HIV-1	TAT
Defosforilación de eIF2	HSV-1	$\gamma 34.5$
Degradación de PKR	RVFV	?
	PV	?
Independencia de eIF2	HCV	
	CrPV	
	SV, SFV	
	Reo	?
	MHV	?
	SARS	?

**Tabla 1**

las células infectadas con Alfavirus, los ARNm virales podrían emplear factores adicionales como eIF2A y/o ligatina para transferir el *Met-tRNA<sup>i</sup>* a los complejos de iniciación (Skabkin et al 2010, Ventoso et al. 2006).

El importante papel de estos mecanismos virales de acción anti-PKR se pone de manifiesto cuando a los virus se les eliminan los genes o estructuras implicadas en bloquear o neutralizar el efecto de PKR. Los virus resultantes son atenuados y generalmente han perdido la capacidad

patogénica que antes tenían en animales (Teng et al. 2000, Liu et al. 2006). Además, suelen replicar a niveles muy bajos en células primarias y presentan una sensibilidad incrementada a los IFNs. Estos virus mutantes resultan muy útiles ya que permiten valorar el papel antiviral de PKR en órganos, tejidos o tipos celulares específicos y que empleando virus salvajes resultaría imposible de estudiar dada la resistencia natural a la quinasa.

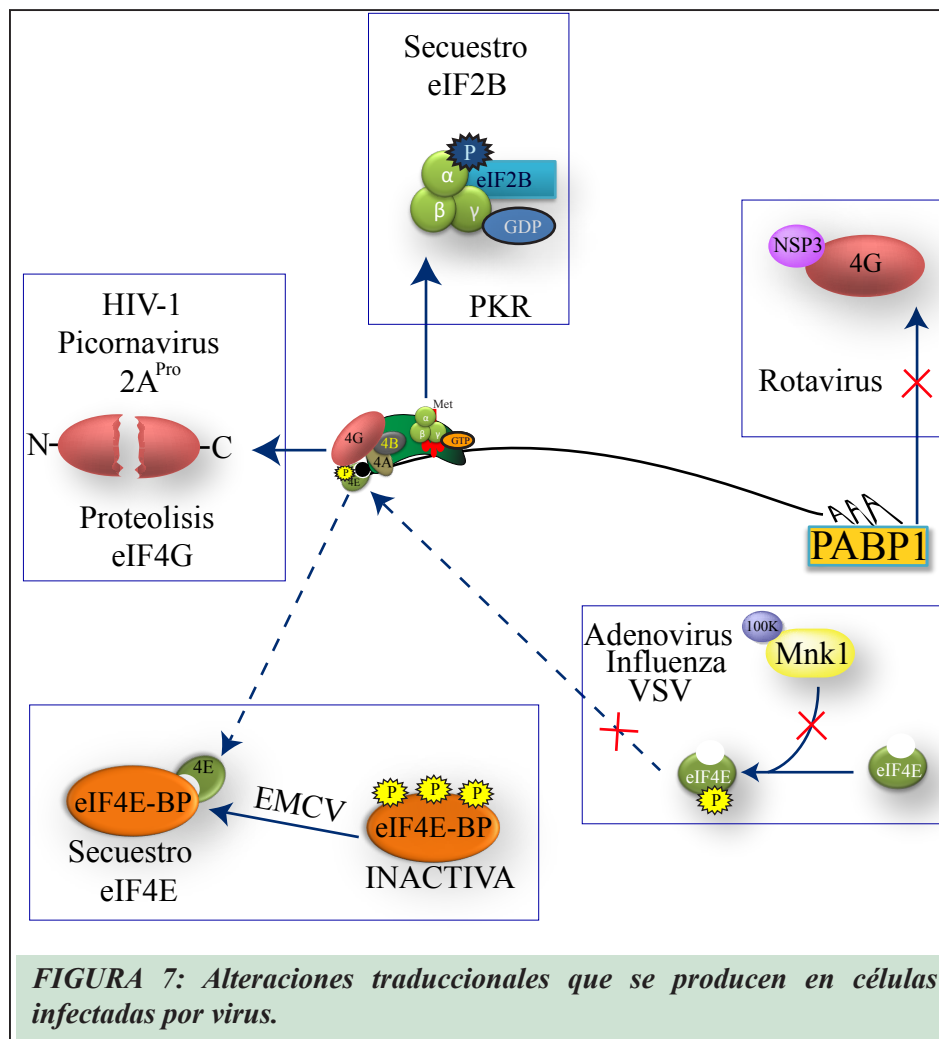
## ***F. ALTERACIONES TRADUCCIONALES EN CÉLULAS INFECTADAS POR VIRUS***

Una característica que comparten la mayoría de los virus citolíticos es la gran eficiencia traduccional de sus ARNm, especialmente aquellos que codifican las proteínas estructurales que conforman los viriones. Debido a la gran cantidad de monómeros de proteína necesarios para conformar un virión (de 60 a 5000 dependiendo del virus), y a las miles de partículas virales producidas por una célula infectada, los virus han maximizado la eficiencia traduccional de sus ARNm durante los procesos de co-evolución con sus huéspedes. Acompañando a este hecho, y en ocasiones como consecuencia de él, los virus citolíticos suelen provocar una profunda inhibición de la traducción del huésped denominada genéricamente *shut off*. Este hecho fue descrito por primera vez a principios de los 60 en células en cultivo infectadas con poliovirus, en donde la traducción celular pasaba a ser sustituida por completo por traducción viral (Holland et al. 1964). Desde entonces, las alteraciones traduccionales se han estudiado en muchos virus diferentes (Huisman 1971, Schneider et al. 1987, van Steeg et al. 1981, Wilson 1968). En términos generales, los virus secuestran o modifican algunos factores de iniciación de la traducción de la célula en su propio beneficio, propiciando la traducción eficiente de sus ARNm y

la simultánea inhibición de la traducción celular. Aunque todavía está por demostrar, que la inhibición de la traducción celular otorgaría al virus ciertas ventajas durante la replicación en animales, tales como impedir que la célula pueda sintetizar proteínas con actividad antiviral como interferones (IFNs) y otras citoquinas. En cuanto a su “intencionalidad”, podemos clasificar las alteraciones traduccionales en dos tipos fundamentales. 1) Las directamente ejercidas por productos virales sobre la actividad de factores de iniciación de la célula. 2) Las llevadas a cabo por la célula como parte de su respuesta antiviral y que ya se ha discutido en el apartado anterior.

Alteración y manipulación de factores de iniciación (**Fig. 7**). La mayoría de los productos virales descritos hasta la fecha implicados en el *shut off* lo hacen alterando la actividad de los factores de unión a cap (eIF4F), PABP o eIF3 (Bushell et al. 2002, Gingras et al. 1996, Joachims et al. 1999, Kerekatte et al. 1999, Schneider et al. 2003). El ejemplo paradigmático es Poliovirus, que expresa una proteasa viral (2Apro) que fragmenta el factor eIF4G, separando sus funciones de unión a cap (a través de la unión con eIF4E) de las implicadas en la unión al ribosoma (a través de la unión a eIF3) (Schneider et al. 2003). De esta manera, poliovirus induce una inhibición de la traducción celular dependiente de cap, mientras que la traducción de sus ARN no se resiente ya que inicia empleando una estructura IRES que no requiere la participación de eIF4E (Semler 2004). Algunos retrovirus como el HIV-1 emplean una estrategia similar (Weill et al. 2010). Otros virus como los rotavirus emplean un mecanismo diferente pero con el mismo resultado. Expresan una proteína viral (NSP3) que compite con PABP por unirse a eIF4G, desplazando a la primera y secuestrando eIF4G hacia las factorías virales donde ocurre la traducción de sus ARNm (Piron et al. 1998, Vende et al. 2000). Otro tipo de estrategia viral consiste en alterar el estado de fosforilación de ciertos factores como eIF4E. El ejemplo mejor conocido es Adenovirus, que a través de su proteína de





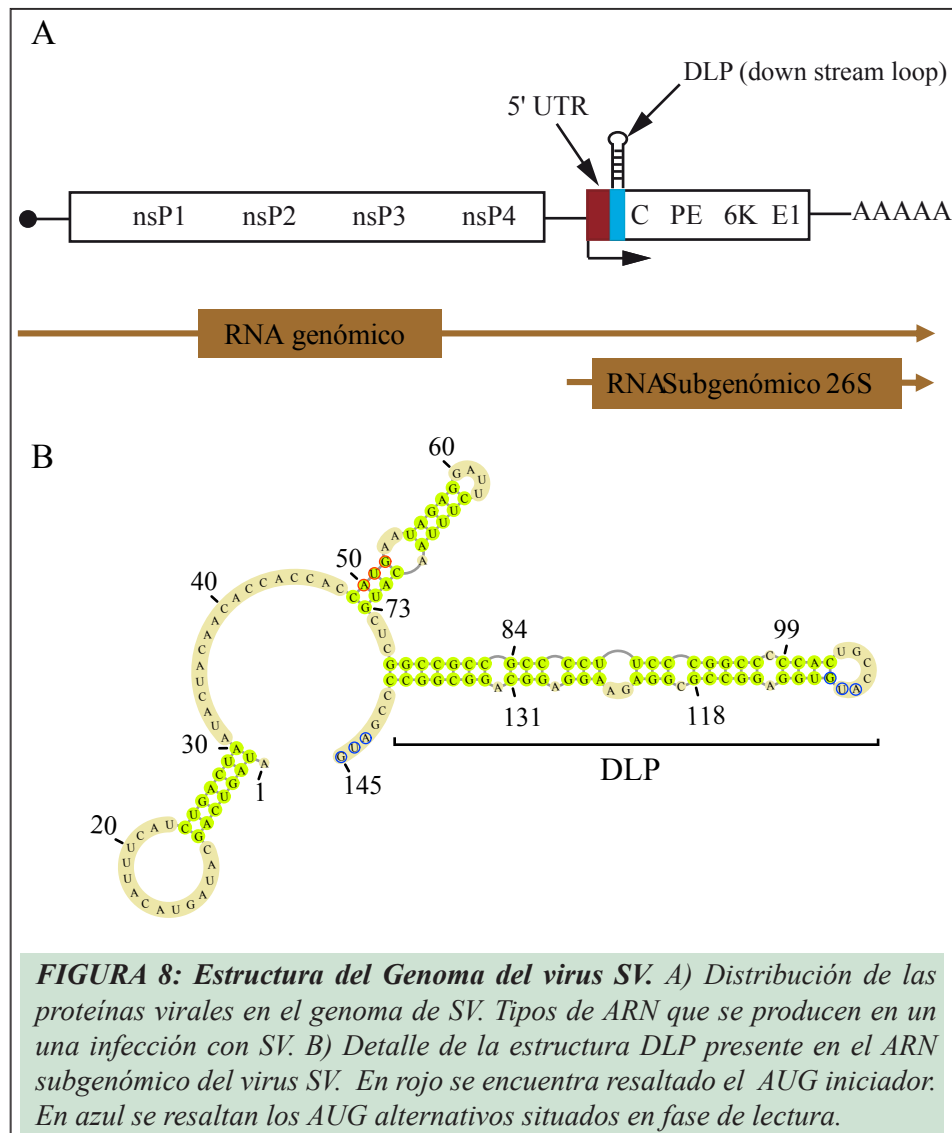
100K bloquea la quinasa Mnk1 promoviendo la defosforilación de eIF4E en las células infectadas (Cuesta et al. 2000). Esta defosforilación se asocia con una bajada en la síntesis de proteínas celulares, mientras que los ARNm de Adenovirus continúan su traducción ya que no requieren la actividad eIF4E. Algo parecido se observa en células infectadas con Influenza o VSV, aunque los productos virales involucrados en esta interferencia no han sido descritos hasta la fecha (Feigenblum et al. 1993). Otra de las alteraciones observadas en las células infectadas con VSV o ciertos picornavirus (EMC) es la defosforilación de las proteínas inhibitoras de eIF4E (4E-BPs). Se

desconoce si es un efecto directo del virus, o una respuesta indirecta de la célula. En cualquier caso, la defosforilación de estos factores promueve el bloqueo de la actividad eIF4E y la inhibición de la traducción dependiente de cap (Kleijn et al. 1996).

Recientemente se han descrito procesos de movilización masiva de ribosomas y de ciertos factores básicos de traducción tales como eIF3 hacia las factorías virales donde ocurre la síntesis de genomas virales y su encapsidación, que atraerían la casi totalidad de estos componentes de la maquinaria de traducción (Castello et al. 2009). Aunque todavía no se conoce cómo ocurre este secuestro a nivel molecular, podría explicar satisfactoriamente el *shut off* celular y el eficaz acoplamiento entre replicación, traducción y encapsidación que los virus llevan a cabo (Breindl et al. 1975, Cooper et al. 1978, Sanz et al. 2007).

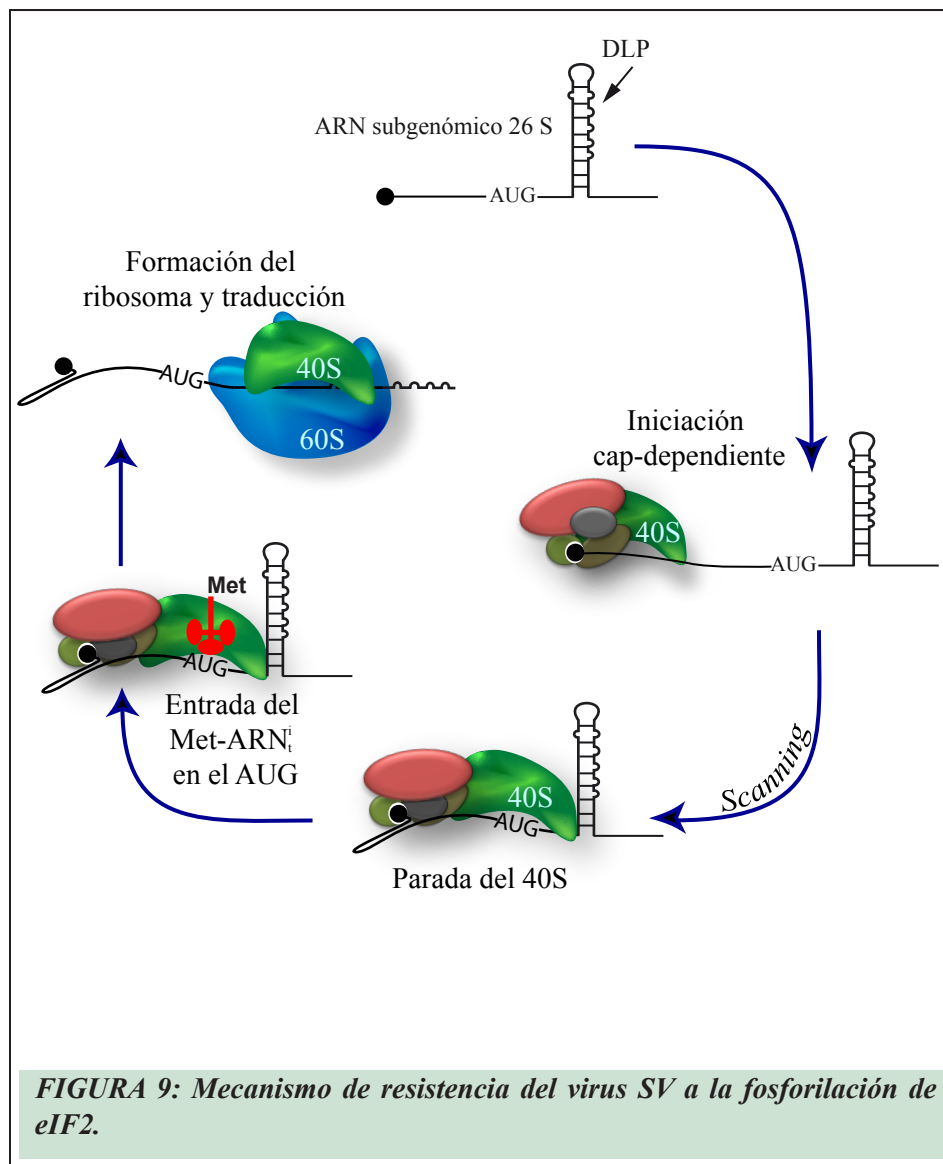
## ***G. ALFAVIRUS***

El género Alfavirus engloba un grupo de virus con genoma ARN de polaridad positiva, que junto al virus de la Rubeola constituyen la familia de los Togavirus. El grupo está constituido por unas 29 especies de virus, algunos de ellos con una amplia distribución geográfica. Son Arbovirus, y por lo tanto alternan la replicación en un vector artrópodo (mosquitos del género *Culex* o *Aedes*) y en uno o más huéspedes vertebrados, que dependiendo del virus pueden ser aves, roedores, marsupiales, équidos o primates incluyendo el hombre (Strauss et al. 1994). Aunque la mayoría de estos virus establecen ciclos enzoóticos con sus huéspedes primarios (generalmente aves y roedores), algunos de ellos provocan brotes epidémicos en caballos y humanos (zoonosis) de considerable relevancia epidemiológica y médica (Strauss et al. 1994). El prototipo de Alfavirus es Sindbis, modelo de estudio empleado en la presente tesis doctoral. Se trata



de un virus con envoltura en la que están embebidas las glicoproteínas virales E1 y E2 de entre 50 y 60 kDa de peso molecular. Esta envoltura recubre una cápsida icosaédrica de simetría T=4 formada por la repetición (240 copias) de la proteínas de la cápsida (C). El interior de la cápsida contiene una única molécula de ARN de banda sencilla y polaridad positiva de aproximadamente 11,7 kb. Se trata de un ARN con cap y poli (A) que incrementan su eficiencia traduccional en eucariotas y está provisto de una

región 5'UTR de 60 nts y de una región 3'UTR de 300 nts (**Fig. 8A**). Funcionalmente, la región codificante del ARN genómico se puede dividir en dos partes. La primera de ellas abarca 2/3 del genoma y codifica las proteínas no estructurales del virus (nsp1, nsp2, nsp3 y nsp4), mientras que la segunda región que contiene un segundo promotor interno codifica las proteínas estructurales del virus (C, E1, E2 y 6K). Es por esto que durante la infección con SV se producen dos tipos de ARNm: el ARN genómico 49S y el ARNm subgenómico 26S (**Fig. 8A**). El ARN genómico puede actuar como ARNm y traducirse en una poliproteína que dará lugar a todas las proteínas no estructurales mediante procesamiento proteolítico controlado (Strauss et al. 1994). La actividad ARN replicasa reside en la proteína nsp4, mientras que nsp1 es una 7metil-guanosil transferasa directamente involucrada en el *capping* de los ARNm virales. La proteína nsp2 exhibe actividad ARN helicasa y proteasa, e interfiere además con algunas etapas de la expresión genética de la célula como la transcripción (Frolova et al. 2002). La función de nsp3 es menos conocida. A partir de un promotor subgenómico situado en la posición 7400 del genoma de SV se sintetizan los ARNm subgenómicos 26S que codifican las proteínas estructurales, inicialmente incluidas en una poliproteína que se procesa por la acción en *cis* de la proteína de la cápsida (C) y proteasas celulares residentes en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. El papel de la proteína C es doble; por una parte exhibe actividad serín proteasa, y por otra une el ARN genómico para iniciar la encapsidación (Aliperti et al. 1978, Nicola et al. 1999, Strauss et al. 1994, Warrier et al. 2008). Los ARNm 26S de SV también están capeados en su extremo 5' y presentan una región 5'UTR de 50 nts con muy poca estructura secundaria. Este hecho, junto con un óptimo contexto del AUG iniciador (ACCATGA) hace que el ARNm se traduzca con una eficiencia muy alta. Por detrás del AUG, y situado a 27 nts hacia el extremo 3', existe una estructura de ARN en forma de horquilla



(*hairpin loop*) de alta estabilidad ( $\Delta G^\circ = -47 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ) que comprende 61 nts (**Fig. 8B**). Su topología ha sido confirmada mediante modificación química y enzimática y mediante mutagénesis dirigida (Ventoso et al. 2006). Se trata de una estructura muy conservada en todas las subespecies y variantes de SV distribuidas en cuatro continentes y que presenta equivalencias en otros Alfavirus como SFV, RRV y EEEV, entre otros. Su

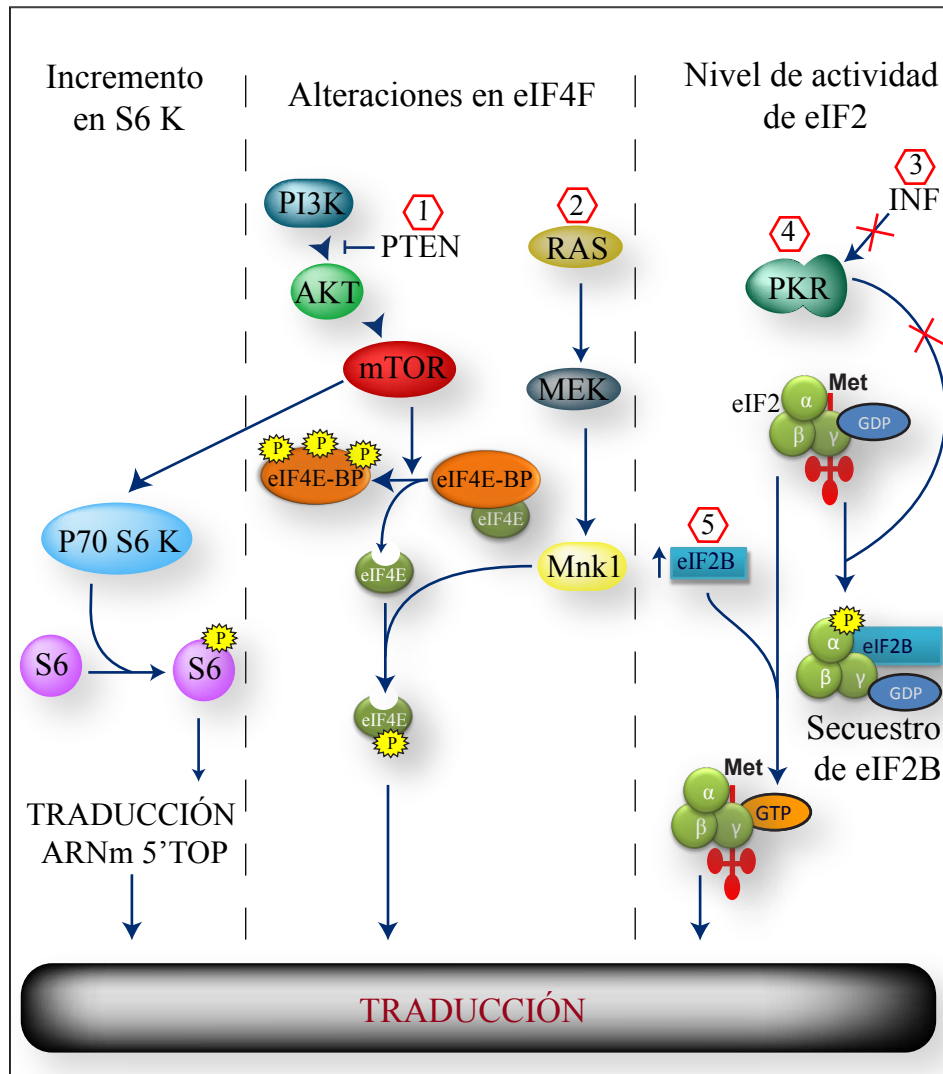
papel fundamental (**Fig. 9**) es permitir que el ARNm 26S se pueda traducir en ausencia de eIF2, actuando de tope durante el *scanning* del ribosoma 40S y permitiendo que éste se pueda posicionar sobre el AUG iniciador de manera correcta.

## ***H. ALTERACIONES TRADUCCIONALES EN CÁNCER***

Durante el desarrollo embrionario las células proliferan rápidamente en respuesta a estímulos concretos. Una vez que alcanzan etapas maduras estos dejan de producirse y hacen que la célula vea disminuida su capacidad de proliferación. Este momento coincide con una disminución de la síntesis de proteínas (Watkins et al. 2002). La existencia de ritmos acelerados de síntesis de proteínas en las células tumorales indican que algunos de estos sistemas de control traduccional se han perdido como consecuencia de la transformación celular (Holland 2004). Algunas de las rutas mitogénicas que se encuentran sobreactivadas en muchos tipos de cáncer como Ras y PI3K controlan importantes aspectos de la traducción celular tales como la actividad de unión a cap o la actividad S6 quinasa, ambas implicadas en proliferación celular (Holland et al. 2004). Además, los niveles de fosforilación basal de eIF2 y la activación de sus quinasas en respuesta al estrés suelen estar alteradas en células transformadas. Las alteraciones en los mecanismos de regulación traduccional que se han encontrado en células tumorales se pueden agrupar en tres tipos (**Fig. 10**):

### ***Alteraciones en la actividad del complejo eIF4F.***

La ruta PI3K desemboca en la activación de la quinasa mTOR, que regula los niveles de fosforilación de las 4E-BPs y por tanto influye indirectamente en la actividad de unión a cap de los ARNm de la célula. Así, las alteraciones oncogénicas en la ruta PI3K, en su mayoría causadas por la ausencia de la proteína supresora de tumores PTEN, promueven la defosforilación



**FIGURA 10: Posibles alteraciones traduccionales en cáncer.** 1) Incremento de la ruta de PI3K que incrementa los niveles de eIF4E y activa a S6K. 2) sobreexpresión de la ruta de RAS que afecta a la fosforilación de eIF4E. 3) Ausencia de respuesta a interferón 4) La ausencia de actividad de PKR reduce el bloqueo traduccional debido a la fosforilación de eIF2 y posterior secuestro de eIF2B. 5) Niveles altos de eIF2B incrementan la traducción incrementando la tasa de recambio de eIF2.

constitutiva de 4E-BPs y la activación permanente de eIF4E. El incremento de la actividad eIF4E se asocia claramente a la transformación tumoral, permitiendo la traducción de ciertos ARNm de alta estructura secundaria en sus 5'UTRs tales como factores de crecimiento (VEGF, EGF) y enzimas (ODC-1) necesarios para proliferación celular (Akiri et al. 1998). La activación de la ruta de Ras y MAP quinasas también afecta en gran medida a la actividad de los factores eIF4E y eIF4G, de modo que en tumores donde es frecuente la activación oncogénica de Ras (tumores de páncreas y glioblastomas), estos eIFs se encuentran frecuentemente hiperfosforilados. La quinasa responsable es Mnk1, que fosforila el factor eIF4E en la Ser 209 y que se asocia a un incremento de la actividad del factor (Waskiewicz et al. 1999).

#### ***Incremento de la actividad S6 quinasa***

La activación de la quinasa mTOR vía PI3K promueve la activación de la p70 S6 quinasa que fosforila y activa la proteína ribosomal S6 que se encuentra localizada en la subunidad 40S (Wool IG 1996). La eliminación de la proteína S6 en ratones desemboca en un bloqueo en la biogénesis de ribosomas y en una parada del ciclo celular (Volarevic et al. 2000). Ésta, a su vez, ha sido relacionada con el incremento de la traducción de ciertos ARNm que presentan en su 5'UTR una región de pirimidinas denominada TOP (Hamilton et al. 2006). Entre los ARNm del tipo 'TOP se encuentran sobre todo proteínas ribosómicas y los factores de elongación como el eEF1A1 y eEF1A2. Estos ARNm se encuentran altamente regulados a nivel de traducción, ya que se almacenan en partículas RNPM las cuales no permiten la traducción, y es tras una estimulación mitogénica cuando se induce su traducción (Meyuhas 2000). Las proteínas codificadas por los ARNm TOP pueden funcionar como proto-oncogenes. A modo de ejemplo,



se ha encontrado la presencia del factor de elongación eEF1A2 amplificado en tumores de ovario y su sobreexpresión provoca un efecto oncogénico en líneas celulares de fibroblastos y en modelos tumorales (Anand et al. 2002, Lee 2003). Por lo tanto, la desregulación de la expresión génica de los ARNm TOP puede tener consecuencias directas en los primeros estadios del cáncer.

### ***Niveles de fosforilación de eIF2***

Los niveles basales de eIF2 y su fosforilación en respuesta al estrés suelen estar alterados en células transformadas. Recientemente se ha descrito que la transformación tumoral se asocia a una regulación negativa de la quinasa PKR en muchas líneas tumorales, lo que impide que respondan a las infecciones virales mediante la fosforilación de eIF2 (Ventoso et al. 2006). En algunos casos se observa una disminución muy acusada de los niveles de expresión de la quinasa, asociado en ciertos tumores linfáticos a deleciones cromosómicas que afectan a este gen (Hii et al. 2004). En otras situaciones la quinasa PKR se expresa a niveles normales pero no es capaz de activarse en respuesta a la infección o a la adición de ARN de doble banda sintético (Strong et al. 1998, Farassati et al. 2001, Balachandran et al. 2004). La actividad de eIF2 también se puede alterar en células transformadas a través de la actividad eIF2B, que en muchas líneas tumorales exhibe niveles excepcionalmente altos de su subunidad catalítica eIF2B $\epsilon$  (Balachandran et al. 2004). La presencia de niveles elevados de eIF2B, que en condiciones normales suelen ser limitantes, neutraliza el efecto de la posible fosforilación de eIF2 mediante un incremento de su recambio GDP-GTP. De esta manera muchas líneas tumorales no ven resentida su traducción tras la fosforilación de eIF2 con estímulos de estrés.

Un aspecto que, en términos generales, caracteriza a las células

transformadas es su insensibilidad al efecto antiviral de los IFNs, lo que las convierte en lugares preferidos por los virus para su replicación. Esta característica impulsó hace más de una década la idea de usar a los virus como agentes anti-cáncer, en lo que se vino a denominar como viroterapia tumoral. El empleo de virus con oncotropismo natural, o virus manipulados genéticamente para restringir su replicación en células tumorales ha experimentado un importante avance desde entonces y en la actualidad se está ensayando la actividad clínica de ciertos virus oncolíticos como NCDV y Adenovirus (Kirn 2001, Liu et al. 2007, Toth et al.2010).





# OBJETIVOS

El objetivo fundamental de esta tesis doctoral es entender mejor las alteraciones traduccionales que ocurren en células y en animales infectados con el virus Sindbis, y valorar su papel en las interacciones parásito-huésped que dirigen la respuesta antiviral, los mecanismos de escape viral y el tropismo del virus. Los objetivos concretos que nos planteamos fueron:

1. Estudiar el papel biológico que la estructura de ARN DLP juega en la traducción viral y en el tropismo del virus *in vitro* e *in vivo*.
2. Estudiar las alteraciones traduccionales que el virus Sindbis induce en animales infectados y en explantes de tejidos.
3. Generar virus recombinantes de Sindbis con marcadores traduccionales que permitan demostrar que el fenómeno del *shut off* también ocurre en animales infectados.
4. Evaluar el oncotropismo y las propiedades oncolíticas de virus Sindbis mutante y otros miembros de la familia de los Alfavirus sobre tumores subcutáneos inducidos en ratones inmunodeficientes.



# MATERIAL Y MÉTODOS

## ***A. BACTERIAS Y CLONACIÓN***

### ***A.1. Cepas, crecimiento y preservación***

Para realizar el trabajo se emplearon las siguientes cepas bacterianas:

DH5α: Cepa de *Escherichia coli* deficiente en recombinación usada comúnmente para el crecimiento de plásmidos.

GM248 (DAM-): se trata de una cepa deficiente en DAM metilación. Se emplearon cuando era necesario digerir los plásmidos con enzimas sensibles a dicha metilación (ej. *Xba* I).

Para el crecimiento de bacterias empleamos dos tipos de medios de cultivo dependiendo de las necesidades. Medio líquido Luria Bertani (LB; 10 g/l de bacto triptona, 5 g/l de extracto de levadura y 10 g/l de NaCl) y medio sólido basado en el anterior al cual se le añade 15 g/l de agar. Los clones bacterianos se preservaron en LB líquido con glicerol al 10% a -70°C.

## ***A.2. Competencia y transformación***

### *A.2.1. Competencia*

*A.2.1.1. Bacterias electro-competentes:* Se inocularon 200 ml de LB con 2 ml de un preinóculo del cultivo y se creció a 37°C hasta alcanzar una DO 600nm entre 0,5 y 1 (fase de crecimiento exponencial). Una vez alcanzado este punto, el cultivo se transfirió a hielo durante 15 minutos y se centrifugó a 4000 xg 30 minutos a 4°C. El sedimento se resuspendió en 200 ml de agua mili-Q estéril fría y se volvió a repetir la operación anterior. A continuación se resuspendió en 20 ml de glicerol al 10% y se repitió la centrifugación. Finalmente se resuspendió en 2 ml de glicerol 10% y se guardaron a -70°C.

*A.2.1.2. Bacterias competentes químicas:* Preparadas por el método del cloruro de rubidio en el servicio de fermentación del CBM.

### *A.2.2. Transformación*

Para purificar los plásmidos de interés, transformamos por choque térmico bacterias competentes. Para ello se incubaron en hielo 50 µl de bacterias competentes con 5 µl de mezcla de ligación (detallado en el punto B5) o 20 ng de plásmido durante 30 min. Posteriormente se sometieron a un choque térmico 40 segundos a 42°C. Una vez hecho esto, se mantuvieron 2 minutos en hielo, se resuspendieron en 1 ml de LB atemperado y se incubaron durante 1 hora a 37°C para que se produzca la expresión fenotípica de los genes de resistencia. Seguidamente las bacterias transformadas se centrifugaron para reducir el volumen y se sembraron en placas de LB con el antibiótico de selección adecuado y se incubaron O/N en una estufa a 37°C.



### *A.2.3. Purificación de plásmidos*

Los plásmidos se purificaron a partir de cultivos bacterianos (1-10 ml) que habían sido crecidos durante toda la noche. El método empleado para la extracción de plásmidos está basado en el método de la lisis alcalina empleando las soluciones de *QIAGEN*. Para preparaciones a mayor escala (200-500 ml) se empleó el *QIAGEN Plasmid Maxi Kit*.

## ***B. Plásmidos y clones infecciosos***

### ***B.1. Plásmidos empleados***

*pcDNA-LUC*: la secuencia codificante de la luciferasa se introdujo en el plásmido pcDNA3.1B (*Invitrogen*).

*p5'C EGFP-N1*: plásmido derivado del pEGFP-N1 (*GenBank* #U55762). Fue construido colocando los 140 primeros nts del ADNc 26S del virus SV delante de la secuencia codificante de EGFP. Los oligonucleótidos *5'L26S\_forward* (CGCGGCTAGCATAGTCAGCATAGTAC) y *5'L26S\_reverse* (CGGTGGATCCCGCGGGGCCGCTGCCTC) que contenían las dianas *Nhe* I y *Bam*H I, fueron empleados para amplificar por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) dicho fragmento el cual fue digerido con los enzimas correspondientes y clonado posteriormente en el plásmido pEGFP-N1 usando los mismos enzimas.

*p5'CΔDLPEGFP-N1*: Plásmido derivado del pEGFP-N1 (*GenBank* #U55762). Construido de la misma forma que el p5'C EGFP-N1 empleando en este caso el ADNc 26S del virus SV-ΔDLP.

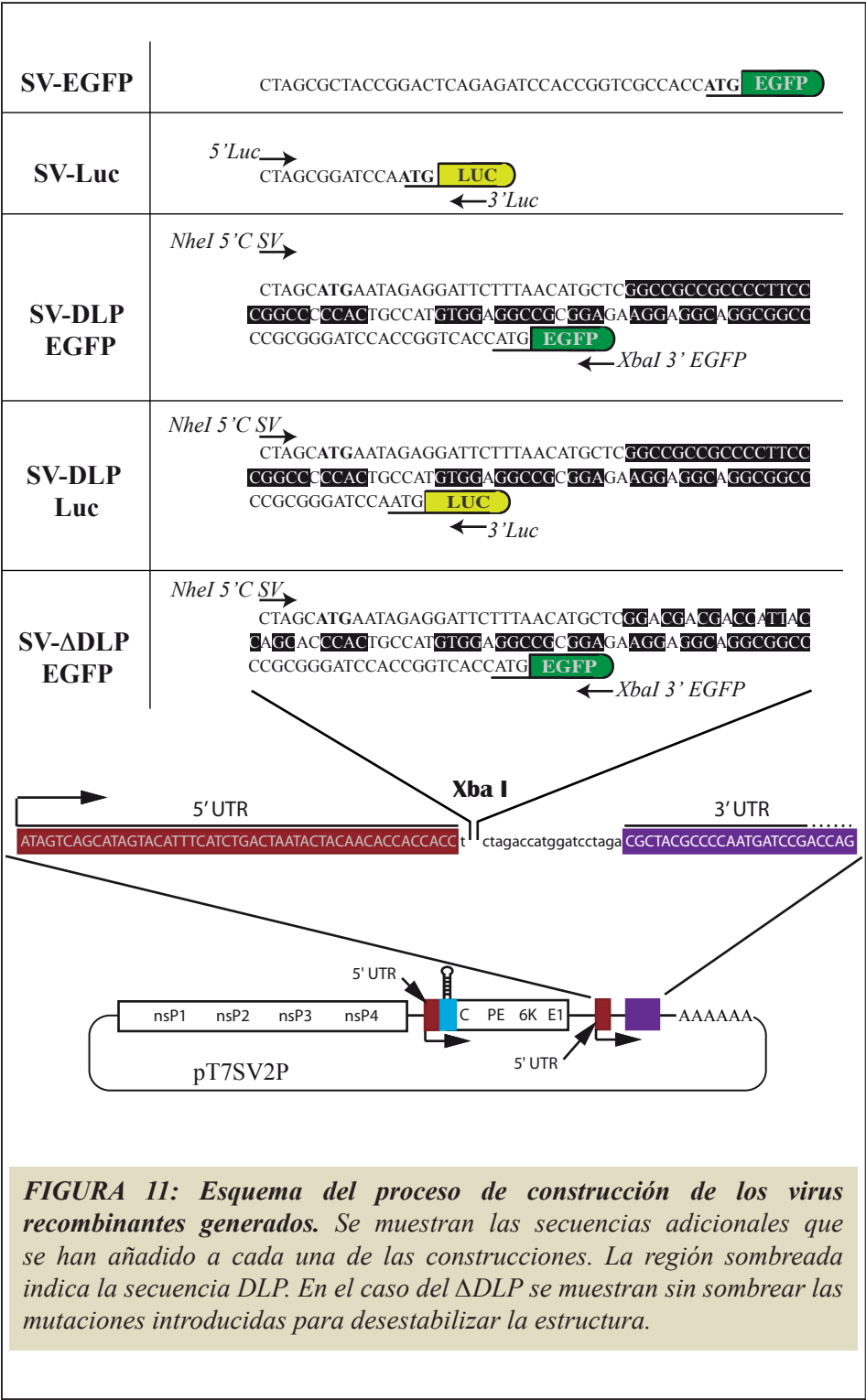
*p5'C Luc-N1*: Se construyó a partir del plásmido p5'C EGFP-N1 sustituyendo el ADNc de EGFP por el de Luciferasa obtenido del pcDNA-

LUC. El plásmido p5'C EGFP-N1 se digirió con *BamH* I y *Xba* I para eliminar la región de EGFP. A continuación, se clonó el ADNc de Luc. Este fragmento se obtuvo por PCR empleando los oligonucleótidos 5'Luc (GGGCGCTAGCGGATCCAATGGAAGACGCCAAAAAC) y 3'Luc (CGCCGCTAGCTTACAATTTGGACTTTCCGCC). El producto de PCR fue digerido con *BamH* I y *Xba* I (presentes en los oligonucleótidos) e introducido en dicho vector, obteniéndose el vector p5'CLuc-N1.

### ***B.2. Construcción de virus recombinantes de SV***

Se construyeron 5 virus Sindbis recombinantes (**Fig. 11**) a partir de un clon infeccioso pT7SV-2p que contiene un segundo promotor subgenómico situado detrás de la región que codifica las proteínas estructurales del virus, y que permite la clonación y expresión de genes heterólogos (*pTE3'2J*) (Hahn et al. 1992). Este plásmido procede del pTE12, una variante del Toto1101 (Rice et al. 1987). Inmediatamente después del segundo promotor subgenómico presenta un sitio de clonaje seguido de la región 3'UTR y la cola de poli A originales del virus. El clon infeccioso presenta una diana de restricción única para *Xho* I empleada para linearizar el vector.

*pSV-Luc*: A partir del plásmido que contiene el gen de la luciferasa (pcDNA-Luc) se llevó a cabo una PCR con los oligonucleótidos 5'Luc (GGGCGCTAGCGGATCCAATGGAAGACGCCAAAAAC) y 3'Luc (CGCCGCTAGCTTACAATTTGGACTTTCCGCC). El producto de PCR fue digerido con *Nhe* I cuyas dianas fueron introducidas en los oligonucleótidos. Posteriormente, el gen Luc fue clonado en el vector infeccioso pT7SV-2p previamente digerido con *Xba* I y defosforilado con fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIP, EC 3.1.3.1 Roche).



*pSV-DLP Luc*: Para la construcción del virus SV-DLP Luc, empleamos el plásmido p5'C Luc-N1 a partir del cual por PCR con los oligonucleótidos *NheI*-5'C SV (GCGCGCTAGCATGAATAGAGGATTC) y 3'*Luc* (CGCC GCTAGCTTACAATTTGGACTTTCCGCC) obtuvimos el fragmento 5'CLuc. El fragmento obtenido que fue digerido con *Nhe I* y clonado en el plásmido infeccioso pT7SV-2p previamente digerido con *Xba I* y defosforilado con CIP.

*pSV-EGFP*: La construcción del virus SV-EGFP se describe en (Ventoso et al. 2006).

*pSV-DLP EGFP*: Se construyó a partir del plásmido p5'CEGFP-N1 amplificando el fragmento 5'CEGFP mediante PCR con los oligonucleótidos *NheI*-5'C SV (GCGCGCTAGCATGAATAGAGGATTC) y *XbaI*-3'EGFP (CGCGCTCTAGATTACTTGTACAGCTCGTC). El producto de PCR fue digerido con *Nhe I* y *Xba I* y clonado como en los casos anteriores en el clon infeccioso pT7SV-2p previamente digerido con *Xba I* y defosforilado con CIP.

*pSV-ΔDLP EGFP*: Se construyó a partir del plásmido p5'CADLP EGFP-N1 de la misma forma que el plásmido pSV-DLP EGFP.

La calidad de los clones infecciosos se comprobó mediante digestión con enzimas de restricción y por secuenciación de los correspondientes insertos.

### ***B.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)***

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 50 µl que contenía el tampón suministrado por la casa comercial, 0,3 mM de cada

dNTP, 0,3  $\mu$ M de cada oligonucleótido cebador, 1,5 mM  $MgCl_2$ , 75-200 ng de ADN molde y 1 unidad de ADN polimerasa *Platinum® Pfx* (*Invitrogen*). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 95°C durante 2 minutos seguido de 35 ciclos a 95°C durante 45 segundos, 60°C durante 45 segundos, 72°C durante 1 minuto, y finalmente 72°C durante 5 minutos. Todo este proceso se realizó en un termociclador *MJ Mini* (*Bio-RAD*)

#### ***B.4. Electroforesis de agarosa y purificación de fragmentos de ADN***

Las muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa (*Pronadisa*) al porcentaje necesario en tampón Tris-acetato-EDTA (Tris 2 M, Ac. Acético 1 M, EDTA 50 mM) con 0,05  $\mu$ g de Bromuro de Etidio junto con marcadores de ADN de tamaño conocido. El resultado fue revelado empleando un transiluminador de UV. Para aislar y purificar fragmentos de ADN procedentes de PCR o a partir de geles de agarosa empleamos el Kit de extracción *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (*Promega*). Estos fragmentos se utilizaron tanto para clonaje, como para generar sondas marcadas radiactivamente y utilizarlas en experimentos de Northern blot.

#### ***B.5. Ligación***

A partir de los fragmentos purificados se procedió a su ligación con la enzima ADN ligasa del fago T4 (Roche). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 30  $\mu$ l empleando una relación molar vector:inserto de 1:3. El tampón empleado para la reacción de ligación fue el suministrado por el fabricante (tampón de ligación 10X: 660 mM Tris-HCl, 50 mM  $MgCl_2$ , 10 mM dithioerythritol, 10 mM ATP, pH 7.5 (20° C)). Las reacciones fueron incubadas a 4°C durante toda la noche.

## ***C. CULTIVOS CELULARES***

Para la realización del trabajo fueron utilizadas diferentes líneas celulares normales y tumorales.

NIH-3T3: Fibroblastos procedentes de embriones de ratón de la cepa *NIH/swiss*. Esta línea celular fue obtenida empleando el protocolo conocido como “3T3” (Nomura et al. 1988).

NIH-3T3-*Pkr<sup>o/o</sup>*: Línea estable de fibroblastos murinos procedentes de ratones KO para el gen *pkr* (Yang et al. 1995).

NIH-3T3-*H-Ras/K-Ras/N-Ras*. Células NIH-3T3 que expresan de forma estable isoformas constitutivamente activas del oncogén *Ras* (Oliva et al. 2004). Estas células presentan un crecimiento diferente a las NIH-3T3. Las H- y K-Ras crecen formando focos, mientras que las N-Ras forman una red celular muy densa.

BHK-21: Fibroblastos procedentes de riñón de hámster Sirio dorado (*Mesocricetus auratus*) recién nacido. Crecen en monocapa y forman tumores de gran tamaño en ratones SCID.

HeLa: Línea celular establecida en el año 1951 a partir de un carcinoma cervical procedente de una mujer afroamericana de 31 años de edad. Presentan aspecto de células epitelioides y crecen en monocapa. Estas células contienen el genoma integrado del Papiloma Virus Humano tipo 18 (PVH-18)

H1299: Línea celular adherente humana procedente de un carcinoma

de pulmón deficiente en expresión de p53 hallado en un varón de origen caucásico de 43 años de edad. Se utilizó también la línea celular derivada H1299 pcDNA-p53 que expresaba de manera estable la proteína p53.

U-87: Línea celular adherente procedente de un glioblastoma de grado IV hallado en una mujer caucásica de 44 años de edad. Presenta morfología epitelial.

Hep-G2. Células adherentes procedentes de un hepatoma diferenciado en un varón caucásico de 15 años. Presentan morfología epitelial.

PC3: Línea celular adherente establecida a partir de una metástasis de un adenocarcinoma de próstata de grado IV localizado en un varón caucásico de 62 años de edad. Presenta morfología epitelial y forma monocapas.

Jurkat: Línea celular de crecimiento en suspensión establecida a partir de sangre periférica de un individuo varón de 14 años de edad con leucemia linfoblástica aguda. Crece de forma individual o formando racimos.

### ***C.1. Mantenimiento y medios de cultivo***

Las líneas celulares BHK-21, U87, HeLa, H1299 y derivadas de NIH-3T3 se crecieron en DMEM (*Medio Eagle Modificado por Dulbecco*) tamponado con NaHCO<sub>3</sub> 0.3% (p/v) a 37°C y con una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. El medio fue suplementado con antibióticos (75U/ml de estreptomicina, 75 µg/ml de penicilina G), 2 mM de L-glutamina y con 10% (v/v) de suero fetal de ternera (FCS) descomplementado a 56°C

durante 30 minutos.

Para el crecimiento de las NIH-3T3 se empleó el mismo medio pero sustituyendo el FCS por suero de ternera recién nacida (NCS) al 10% (v/v).

Las líneas celulares HepG2, Jurkat y PC3 se crecieron en medio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) tamponado con  $\text{NaHCO}_3$  0.3% (p/v) a 37°C y con una atmósfera de 5%  $\text{CO}_2$  y 95% de humedad. El medio fue suplementado con antibióticos (75U/ml de estreptomicina, 75µg/ml de penicilina G), 2mM de L-glutamina y con 10% (v/v) de suero fetal de ternera (FCS) descomplementado a 56°C durante 30 minutos. El medio empleado para el crecimiento de la línea celular PC3 fue además suplementado con N-2-hydroxyethylpiperazina-N'-2-ethanosulfonato (HEPES), pH 7.4 (20 mM). El medio empleado en la línea celular HepG2 además de contener HEPES a la misma concentración, fue suplementado con  $\beta$ -mercaptoetanol.

Las células adherentes fueron subcultivadas a partir de monocapas subconfluentes mediante tripsinización con una mezcla de 0,05% de tripsina y 0,02% EDTA, previo lavado con EDTA 0,02%. La tripsinización se detuvo añadiendo 1 ml de medio de cultivo con suero, las células se recogieron mediante centrifugación y se resuspendieron en el medio correspondiente en función del tipo celular y se sembraron a la densidad necesaria.

Las células en suspensión se mantuvieron a una densidad de  $2 \times 10^5$  células/ml y cada tres días de diluyeron 1:3 en medio fresco.

### ***C.2. Congelación de células***

Las células fueron criopreservadas en FCS suplementado con 15%



de DMSO estéril. Para que la congelación tuviera lugar lentamente, los criotubos se depositaron en un *Nalgene® Cryo 1°C Freezing Container* y se guardaban a -80 °C durante 2 días. Después de 2 días a -80 °C los criotubos se pasaron a un contenedor de nitrógeno líquido (-196 °C) para su conservación a largo plazo.

## ***D. Obtención de virus recombinantes***

### ***D.1 Transcripción in vitro***

#### ***D.1.1 Preparación del ADN***

Para obtener partículas virales infecciosas a partir de un clon de SV empleamos 20-25 µg del plásmido linealizado con el enzima *Xho* I. Una vez comprobada la completa linearización del plásmido en un gel de agarosa al 1%, se extrajo con Fenol:Cloroformo:Alcohol isoamílico. (25:24:1) y la fracción acuosa se precipitó en 2 volúmenes de isopropanol. Tras la centrifugación 8.000 xg durante 10 minutos a 4°C, el sedimento de ADN se lavó dos veces con etanol al 70%. El sedimento se secó empleando un sistema de vacío (*speed-vac*) y se resuspendió en 15-20 µl de agua libre de RNAsas (*Ambion*). La pureza de este ADN fue crítica para un buen rendimiento de la transcripción.

Transcription Optimized 5X Buffer	5 µl
DTT (100mM)	3 µl
Recombinant RNasin® Ribonuclease ( <i>Promega</i> )	0,3 µl
Mezcla rNTP (ATPr 5mM, CTP 5mM, UTP 5mM , GTP 0,5mM) ( <i>Roche</i> )	6 µl
Análogo de CAP Ribo m7G Cap, (5mM)	6 µl
ADN linearizado (5µg)	1-2 µl
ARN polimerasa de T7	1 µl
Agua libre de nucleasas hasta 30µl	

***Tabla 2***

### *D.1.2 Transcripción in vitro*

Para la transcripción *in vitro* empleamos la ARN polimerasa de T7 (*Promega*) en presencia de un análogo del CAP (7-Metil GTP, *Promega*). Las concentraciones se optimizaron para obtener un buen compromiso entre el rendimiento y eficiencia de *capping* (**Tabla 2**).

El tamaño y la integridad del transcrito obtenido se analizaron en geles de agarosa del 0,8%.

### *D.2 Electroporación del ARN viral*

El ARN obtenido en la transcripción *in vitro* con clones infecciosos fue empleado para electroporar células BHK-21 y producir partículas infecciosas. Para ello, 2µg de la mezcla de transcripción fue empleada directamente para electroporar 10<sup>6</sup> células BHK-21 (Dos pulsos de 500V 25µF). Transcurridas 48 horas post electroporación (hpe), se recuperó tanto el medio como los restos celulares los cuales fueron lisados por congelación y descongelación. La fracción resultante de este proceso se empleó para la purificación de las partículas virales infecciosas.

### *D.3 Material infeccioso: Los virus*

Virus empleados:

Aura: Familia *Togaviridae* genero *Alfavirus*. Cepa BeAR 10315 procedente de Brasil, conservada en forma de lisado de mosquito (*Culex* sp). ( *American Type Culture Collection* , ATCC)

Sindbis: Virus con envoltura perteneciente a la familia *Togaviridae* genero *Alfavirus*. Cepa AR 339 procedente de Sindbis, Egipto.

Sindbis ΔDLP: Mutante generado a partir del virus SV-WT mediante la inserción de mutaciones puntuales tal y como se muestra en la

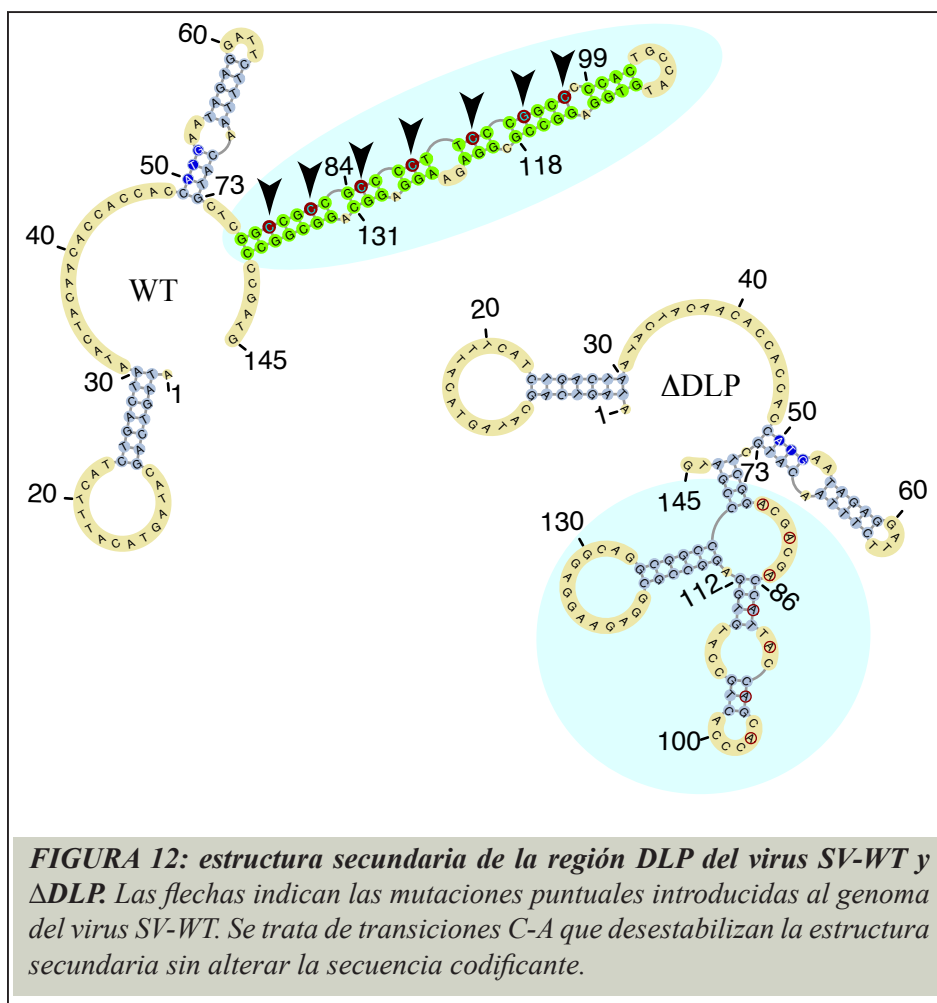


figura y se describe en (Ventoso et al. 2006).

## ***E. PURIFICACIÓN DE PARTÍCULAS INFECCIOSAS***

### ***E.1. Colchón de sacarosa***

Se purificó el medio recuperado junto con el lisado celular procedente de la electroporación de 5-10 placas p100 (30-48 h después). En tubos de polialomero de 38 ml (*Beckman*) preparamos un colchón con 2 ml de sacarosa al 55% y 6 ml al 20% en TNE (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM NaCl y 0,5 mM EDTA pH8.0). Una vez clarificado el sobrenadante

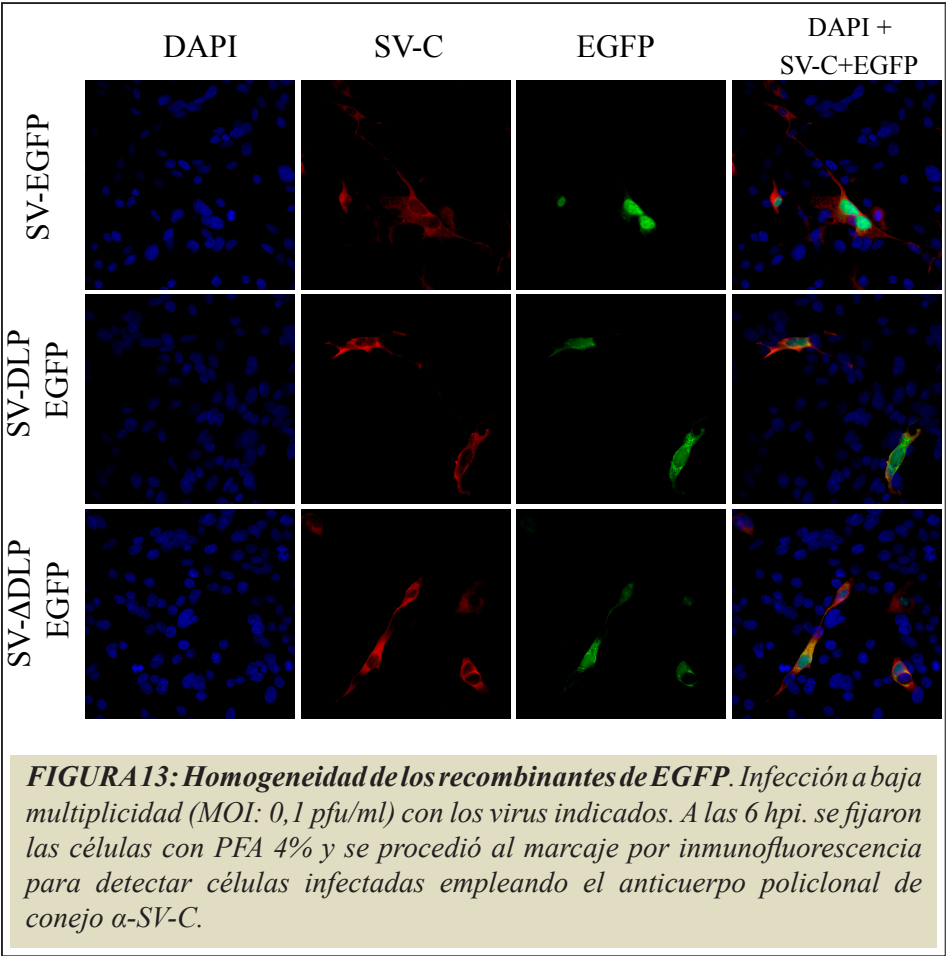
por centrifugación para eliminar restos celulares, lo aplicamos al colchón de sacarosa y lo centrifugamos a 4°C durante 4 horas a 27000 rpm en un rotor SW-28-ti (*Beckman Coulter*) para sedimentar el virus en la fracción concentrada de sacarosa (55%). Recuperamos los últimos 3 ml del tubo en tres fracciones (F1, F2 y F3) siendo F1 la más próxima al fondo del tubo y por lo tanto, la que presentaba un título viral más elevado.

### ***E.2. Precipitación con polietilenglicol (PEG)***

Otro método de purificación puesto a punto en el laboratorio para el virus Sindbis y que ya había sido empleado para otros virus (Fayet 1970, Horzinek 1969, McSharry et al. 1970), es la precipitación con polietilenglicol (PEG). Para ello, los sobrenadantes con el virus previamente clarificado por centrifugación para eliminar restos celulares se ajustaron a 10% de PEG (a partir de una solución 2x al 20% PEG en TNE). Y se incubó durante 4-6 horas a 4°C con agitación suave. Pasado ese tiempo, centrifugamos la mezcla a 10.000 xg en una centrífuga refrigerada 30 minutos. Eliminamos el sobrenadante y lavamos suavemente el sedimento con PBS (tampón fosfato salino: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM) para eliminar los restos de PEG. Retiramos el PBS y resuspendemos con 1/10 del volumen inicial de TNE sacarosa 20%.

## ***F. TITULACIÓN DE LAS PREPARACIONES VIRALES***

Empleamos el ensayo estándar de plaquéo en agar en células BHK-21. Se infectaron monocapas de células sembradas el día anterior en pocillos de placas M6 a una densidad de 5x10<sup>5</sup> células/pocillo. Se retiró el medio de cultivo y se añadió 1 ml de inóculo viral a cada pocillo con las diluciones correspondientes en DMEM sin suero. Tras 1 hora de adsorción, se retiró el inóculo y se añadieron 3 ml de medio de plaqueo por



pocillo el cual fue atemperado previamente a 45°C (DMEM 1x + mezcla de antibióticos + glutamina + suero FCS al 3% y agarosa al 0,7%). Pasados 3 días, las placas se fijaron con formaldehído 10% y tras retirar la agarosa se tiñeron con cristal violeta 0,2% en formaldehido 10%. Después de 5 minutos de incubación, se lavaron con abundante agua y se procedió a contar las unidades formadoras de placas (ufp).

**G. HOMOGENEIDAD DE LOS RECOMBINANTES**

Para comprobar la homogeneidad genética de los virus que expresan

EGFP llevamos a cabo un ensayo de inmunofluorescencia para cuantificar el porcentaje de células infectadas con marcaje positivo para EGFP. Infectamos células NIH-3T3-Pkr<sup>0/0</sup> crecidas sobre cristales con los virus SV-EGFP y SV-DLP EGFP a MOI 0,1pfu/célula. A las 6 hpi. se fijaron las células con PFA 4% y se procedió al marcaje por inmunofluorescencia para detectar células infectadas empleando el anticuerpo policlonal de conejo anti-SV-C junto con un anti-conejo-alexa-555 según el protocolo que se explica más adelante.

Mediante este ensayo comprobamos que los niveles de homogeneidad alcanzaron el 85-90% de correlación entre células infectadas y positivas para EGFP (**Fig. 13**).

## ***H. INFECCIONES IN VITRO***

Para las infecciones se emplearon habitualmente placas L-24 sobre las que se sembraron las células para infectarlas con los virus a una multiplicidad de infección deseada en medio de cultivo libre de suero. Después de 1 hora de adsorción se elimina el inóculo viral y se añade medio fresco con suero 10%. A los tiempos indicados las células fueron lavadas con PBS ó medio DMEM sin suero dependiendo del ensayo a realizar.

## ***I. Animales***

### ***I.1. Cepas y manipulación***

Se emplearon animales de la cepa 129/sv (*Charles River*) y ratones Pkr<sup>+/+</sup> y *knock out* Pkr<sup>0/0</sup> (cedidos por el Dr J. C. Bell de la Universidad de Ottawa, Canada (Abraham et al. 1999)). Además fueron empleados ratones *Fox Chase SCID® Mouse* (CB17/Icr-Prkdcscid/IcrCrI) (*Charles*

*River*). Los animales fueron mantenidos con un fotoperiodo día/noche de 12 horas y la temperatura ambiente se mantuvo entre 20-25 °C. En todo momento los animales dispusieron de comida y bebida *ad libitum*. Todo el manejo de animales fue llevado a cabo siguiendo las pautas establecidas en el *Real Decreto 1201/2005 de 10 de octubre* sobre protección de los animales utilizados en experimentación. Los animales empleados en los procedimientos tenían una edad comprendida entre las 4 y las 6 semanas.

### ***1.2. Inoculación de virus.***

Para la inoculación con virus, los animales fueron anestesiados con isofluorano (2-3%) mezclado con O<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>O. En el caso de la inoculación con virus empleamos dos rutas diferentes: Intranasal, donde inoculamos entre 30 y 50 µl de la preparación viral en cualquiera de las fosas nasales. También empleamos la vía intraperitoneal en la que el volumen de inóculo fue de 200 µl. En este caso la inyección se realizó en la región abdominal empleando una aguja 25G con una inclinación de 45°.

### ***1.3. Inducción de tumores***

Para la inducción de tumores subcutáneos con BHK-21 se emplearon células subconfluentes en situación óptima de crecimiento y libre de micoplasmas. Las monocapas subconfluentes se tripsinizaron como se explica anteriormente. Lavamos con PBS para eliminar restos de medio y resuspendimos las células en el volumen de PBS necesario para alcanzar una densidad de 5 x 10<sup>6</sup> células/ml (1 x 10<sup>6</sup> células en 200 µl) y las mantenemos en hielo hasta su inoculación. La inoculación la realizamos utilizando una jeringuilla de 1ml y una aguja 25G sobre el ratón anestesiado. Se inocularon 200 µl/ratón en el flanco derecho, justo en el pliegue entre la pata y el costado del animal. El tiempo de latencia a partir

del cual empezamos a medir el crecimiento del tumor fue de una semana.

#### ***1.4. Extracción y conservación de las muestras***

Al final de cada procedimiento, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical empleando una anestesia profunda previa con isoflurano. Los órganos extraídos para ensayo de actividad luciferasa y replicación viral fueron congelados inmediatamente por inmersión en N<sub>2</sub> líquido hasta el momento de ser utilizados. Los órganos y tejidos extraídos para histología fueron fijados en PFA 4% al menos 24 horas a 4°C. Una vez

NOMBRE	DILUCIÓN	TIPO	ESPECIFICIDAD
<b>Anticuerpos primarios</b>			
Anti SV-C	1/2000	Policlonal de Conejo	Reconoce la proteína C de la cápsida de SV.
Anti PKR (Santa cruz)	1/400	Policlonal de Conejo	Reconoce la proteína PKR
Anti eIF2 $\alpha$ (Santa cruz)	1/500	Policlonal de Conejo	Reconoce la subunidad $\alpha$ del factor eIF2
Anti eIF $\alpha$ (Ser51-P)	1/400	Policlonal de Conejo	Reconoce la fracción foforilada del factor en la Ser51
Anti eIF2B $\epsilon$ (Santa cruz)	1/400	Monoclonal de ratón	Reconoce la subunidad $\epsilon$ del factor eIF2B
Anti GFP (Roche)	1/1000	Monoclonal de ratón	Reconoce la proteína GFP
Anti- $\beta$ Actina (Roche)	1/500	Monoclonal de ratón	Reconoce la proteína $\beta$ -actina
<b>Anticuerpos secundarios</b>			
Anti conejo-HPRT (Promega)	1/2500	Policlonal de mono	Anticuerpos primarios de conejo
Anti Ratón-HPRT (Promega)	1/2500	Policlonal de mono	Anticuerpos primarios de ratón

***Tabla 3***



fijado, fueron hidratados con sacarosa 30% durante 48 horas.

## ***J. EXPLANTES***

Para los experimentos *ex vivo* se utilizaron explantes de hipocampo de rata de 6 días de edad (Correia et al. 2008). Estos tejidos fueron amablemente cedidos por los investigadores del laboratorio del Dr. José A. Esteban (CBMSO).

### ***J.1. Infección de los explantes***

Para la infección de los explantes con los virus fueron preparados los inóculo ( $1 \times 10^5$  pfu/ $\mu$ l) empleando medio de cultivo si fuera necesario. La inoculación fue realizada aplicando directamente dos dosis de 2-5  $\mu$ l sobre el explante, esperando 5 minutos entre cada aplicación. El avance de la infección se comprobó siguiendo la expresión de EGFP utilizando un microscopio invertido Axiovert 135 (Zeiss)

## ***K. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS.***

### ***K.1 Western blot***

#### ***K.1.1. Obtención y preparación de las muestras***

Las muestras empleadas para la inmunodetección por western blot procedían tanto de células en cultivo como de tejidos murinos necesitando un tratamiento específico para cada una de ellas dependiendo de su procedencia.

##### ***K.1.1.1. Muestras procedentes de cultivos celulares***

Se obtuvieron extractos proteicos totales. Para ello retiramos el medio de cultivo y lavamos la monocapa con medio de cultivo frío y sin

suero. Para obtener los extractos celulares, las células se lisaron en 100 µl de tampón de lisis. (0.15 M Tris-HCl a pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 0.1 M DTT, 0.02% de azul de bromofenol). Una vez lisadas, las muestras se congelaron a -20°C hasta su utilización.

*K.1.1.2. Muestras procedentes de tejidos murinos:* Fue necesario homogeneizar las muestras antes de lisar con tampón de lisis y para ello utilizamos un politrón Micra D1. Homogeneizamos el tejido u órgano en 2-3 ml de PBS a 4°C para evitar el calentamiento de la muestra y centrifugamos a 1000 xg para separar los restos celulares del homogenado. Mezclamos 100µl de sobrenadante con 100µl de tampón de lisis. (0.15 M Tris-HCl a pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 0.1 M DTT, 0.02% de azul de bromofenol). Una vez lisadas, las muestras se congelaron a -20°C hasta su utilización.

#### *K.1.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida*

Las muestras fueron desnaturalizadas por ebullición durante 10 minutos, se separaron por electroforesis en minigeles (10x10x0,1cm) desnaturalizantes de poliacrilamida al 10%-12%. (SDS-PAGE) Las electroforesis fueron llevadas a cabo en tampón Tris-Glicina (25 mM de Tris, 192 mM de glicina, SDS 0,1 %) durante 2 horas a 80 V (sin límite de amperaje). Se empleó como marcador de peso molecular el *Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range (Biorad)*.

#### *K.1.3. Transferencia a membrana de nitrocelulosa*

Las muestras se transfirieron a nitrocelulosa empleando, según las circunstancias, transferencia húmeda durante toda la noche a 25 V a 4°C o semi-seca a 25 V y 200 mA durante 45 minutos para un minigel. Tampón de transferencia húmeda (25 mM Tris, 192 mM de Glicina, pH

8.3, metanol 20% y 0.1% SDS). Tampón de transferencia semi seca (48 mM Tris, 39 mM de Glicina, pH 9.2, metanol 20% y 0.0375% SDS). A continuación, las membranas se bloquearon en PBS 0.05% Tween 20 y 5% de leche desnatada (solución de bloqueo) en polvo a excepción de las que serían incubadas con anticuerpos anti PKR que no fueron suplementadas con Tween 20.

#### *K.1.4. Inmunodetección y revelado*

Las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios correspondientes en solución de bloqueo (**Tabla 3**). Tras 1-2 horas de incubación, se lavaron las membranas con PBS 0.05% Tween 20. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente durante 45 minutos y se lavaron de nuevo con PBS 0.05% Tween 20 durante 1 hora. Antes de revelar con el sistema *Amersham ECL Plus™ Western Blotting Detection Reagent* las membranas fueron lavadas con PBS.

### **K.2. Inmunofluorescencia**

#### *K.2.1. Obtención y preparación de las muestras*

##### *K.2.1.1 Procedentes de cultivos celulares*

Para realizar inmunofluorescencia sobre células en cultivo colocamos cubreobjetos circulares de vidrio en el fondo de la placa de cultivo antes de sembrar las células. Una vez llegado el momento de la inmunodetección se procedió a fijar las células con PFA 4%. Para ello se retiró el medio de cultivo y se lavó la monocapa con PBS. Seguidamente fue añadido el PFA 4% lentamente y se incubó durante 20 minutos a RT. Para finalizar se retiró el PFA y se lavó con PBS para eliminar completamente el PFA. Las células permanecieron en PBS a 4°C y en oscuridad hasta su

Solución	Tiempo
Xileno	10 minutos
Etanol Abs	5 minutos
Etanol 90%	5 minutos
Etanol 80%	5 minutos
Etanol 70%	5 minutos
Etanol 50%	5 minutos
Agua destilada (x2)	10 minutos

**Tabla 4**

utilización.

#### *K.2.1.2 . Procedentes de tejidos murinos*

Para la inmunofluorescencia de tejidos fue necesario un paso previo de procesamiento. Se emplearon dos tipos de cortes dependiendo del material de estudio, que fueron llevados a cabo por el servicio de histología del Centro Nacional De Biotecnología (CNB).

*K.2.1.2.1.Cortes de cerebro con criostato:* una vez hidratados los cerebros con sacarosa, fueron congelados en OCT. Los cortes coronales del cerebro (15µm) se mantuvieron congelados a -20°C hasta su utilización. En el momento de ser utilizados los portaobjetos con las secciones fueron descongelados y delimitados con un rotulador hidrofóbico (*pap pen*) para restringir la presencia del anticuerpo a la región del corte. Fue realizada una post fijación de los cortes con PFA 4% 10 minutos a 4°C.

*K.2.1.2.2 Cortes parafinados de tumores:* una vez hidratados los tumores con sacarosa, fueron deshidratados y embebidos en parafina. Los cortes (5 µm) fueron conservados a RT hasta su utilización. En el momento de ser utilizados, los portaobjetos con las secciones fueron

ANTICUERPOS PRIMARIOS					
NOMBRE	DILUCIÓN			TIPO	ESPECIFICIDAD
	C	Ex	T		
Anti SV-C	1/500	1/100	1/300	Policlonal de Conejo	Reconoce la proteína C de la cápsida de SV.
Anti eIFα (Ser51-P)	-	1/200	1/200	Policlonal de Conejo	Reconoce la fracción foforilada del factor en la Ser51
ANTICUERPOS SECUNDARIOS					
NOMBRE	DILUCION		ABSORCIÓN / EMISION		TIPO
Anti conejo Alexa-555 Invitrogen	1/500		560 nm	576 nm	Policlonal de mono
Anti conejo Alexa-488 Invitrogen	1/500		495 nm	519 nm	Policlonal de mono

**Tabla 5**

incubados durante 30 minutos a 60°C en estufa para retirar el exceso de parafina. Después de esto, se llevó a cabo el completo desparafinado de las secciones y su hidratación. Los tiempos y soluciones utilizados se recogen en la tabla 4.

Las secciones fueron delimitadas con un rotulador y post-fijadas con PFA 4% tal y como se describe en el apartado anterior.

*K.2.1.3 Procedentes de Explantes:* los explantes fueron extraídos de la placa de crecimiento junto con la membrana sobre la que se mantienen en cultivo. Para ello colocamos el disco que contiene la membrana con los explantes sobre la tapadera de una placa p100. Con una cuchilla estéril cortamos alrededor del explante y retiramos el disco. El explante queda sobre la placa de forma que lo podemos coger con unas pinzas y colocar en un pocillo de M96. Los explantes se fijaron con PFA 4% durante 20 minutos a RT, se lavaron con PBS y se mantuvieron a 4°C en oscuridad hasta su utilización.

### *K.2.2 Inmunodetección*

El procedimiento es común para todas las muestras independientemente de su procedencia. Las incubaciones tanto de células como de los explantes se hicieron en flotación mientras que los cortes fueron incubados sobre los propios portaobjetos. Las muestras fueron incubadas en tampón PBS con cloruro de amonio 50mM durante 20 minutos para reducir la autofluorescencia del PFA. Seguidamente se permeabilizaron con PBS y Tritón-X100 (0.1% para células en cultivo y 0,2% para el resto de muestras) durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se procedió a bloquear las uniones inespecíficas con solución de bloqueo (PBS+ 0,1% Tritón-X100 + 5% BSA) durante 1 hora a RT. Para la incubación con el anticuerpo primario, las secciones se dejaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente diluido en solución de bloqueo, en una cámara húmeda para evitar su evaporación. La dilución de cada anticuerpo primario se muestra en la tabla 5.

Después de la incubación con el anticuerpo primario, las muestras fueron lavadas con PBS con Tritón-X100 3 veces durante 15 minutos e incubados durante 1 hora a RT con su anticuerpo secundario correspondiente diluido en solución de bloqueo en una cámara húmeda para evitar su evaporación. Esta incubación se llevó a cabo en total oscuridad. La dilución de cada anticuerpo secundario se muestra en la tabla.

Transcurrido el tiempo de incubación, fueron lavadas con PBS con 0,1% Tritón-X100 3 veces, seguidos de una incubación en oscuridad durante 3 minutos con DAPI diluido 1/5000. Finalmente las muestras fueron lavadas dos veces durante 5 minutos con PBS para eliminar el exceso de DAPI.

Las muestras procedentes de cortes histológicos se montaron con Fluor Save (*Calbiochem*) y colocando un cubreobjetos de 24 x 60 sobre la preparación eliminando las burbujas y presionando de manera homogénea por toda la muestra. Una vez secas las preparaciones, éstas se analizaron con un

microscopio de Barrido Láser confocal *LSM510* acoplado a un microscopio vertical *Axio Imager Z1 M* (Zeiss). También fue utilizado el microscopio de barrido láser confocal y multifotón *LSM710* y *LSM510* acoplados a un microscopio invertido *AxioObserver* y uno vertical *AxioImager M1* (Zeiss), respectivamente.

Para los explantes se empleó como medio de montaje *ProLong® Gold Antifade Reagent* (Invitrogen). Es importante no presionar los explantes para no provocar una desestructuración del tejido. Para el análisis de las muestras fue utilizado el microscopio de barrido láser confocal y multifotón *LSM710* y *LSM510* acoplados a un microscopio invertido *AxioObserver* y uno vertical *AxioImager M1* (Zeiss), respectivamente.

Las muestras procedentes de cultivos celulares se montaron con *ProLong® Gold Antifade Reagent* (Invitrogen) colocando el medio de montaje sobre el portaobjetos y depositando el cristal con las células hacia abajo sobre el medio de montaje. Para el análisis de las preparaciones se utilizó un microscopio vertical *Axioskop2 plus* (Zeiss) acoplado a una cámara ccd color.

Las incubaciones tanto de células como de los explantes se hicieron en flotación mientras que los cortes fueron incubados sobre los propios portaobjetos.

### ***K.3. Marcaje metabólico con [ $^{35}$ S]Met/Cis***

Fue realizado en células en cultivo infectadas con los virus correspondientes (MOI: 25 pfu/célula) para estimar la síntesis *de novo* de proteínas en esas condiciones. A las 5:30 hpi las células fueron incubadas durante 30 minutos en medio de marcaje (DMEM 1x libre de Met/Cis suplementado con antibióticos (75U/ml de estreptomicina, 75µg/ml de penicilina G), 2mM de L-glutamina, 10% (v/v) de suero y 25 µCi/ml de [ $^{35}$ S]-Met/Cis). A continuación retiramos el medio de marcaje y lavamos

con medio sin suero. Finalmente recogimos las células con 100µl de buffer de lisis. (0.15 M Tris-HCl a pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 0.1 M DTT, 0.02% de azul de bromofenol). Una vez lisadas se congelaron las muestras a -20°C hasta su utilización. Las muestras fueron desnaturalizadas por ebullición y separadas en un gel de poliacrilamida de la misma manera que para el western blot. Una vez finalizada la electroforesis, se procedió con la fluorografía para aumentar la señal del gel. Fijamos el gel con acético 7,5% y etanol 25% durante 15 minutos en agitación. Seguidamente eliminamos la solución de fijación y lavamos con agua abundante durante 15 minutos. A continuación sumergimos el gel con salicilato sódico 1M durante 1 hora. Finalmente el gel fue secado al vacío a 80°C y expuesto a película de rayos X (Agfa) el tiempo necesario a -70°C.

#### ***K.4. Northern Blot***

##### *K.4.1 Extracción de ARN celular y viral*

El ARN total de células infectadas (MOI: 25 pfu/célula) y sin infectar fue aislado utilizando el sistema de Purificación *RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen)* siguiendo en todo momento las instrucciones del fabricante. La calidad del ARN fue comprobada mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8%. Además, fue cuantificado utilizando un espectrofotómetro Nanodrop (*Nanodrop Technologies*). Las muestras fueron conservadas a -70°C hasta el momento de su utilización. El ARN se desnaturalizó a 60°C en el tampón de carga de ARN (Tampón de carga de ARN 2x: 50% formamida, 4,4% formaldehído, 20% MOPS 5X, 80 µg/ml bromuro de etidio y 13,6% glicina) durante 5 minutos y se separó mediante electroforesis en geles desnaturalizantes del 0,8% agarosa, 10% de MOPS 1X y 1,7% de formaldehído a 80 V durante 1,5 horas en tampón MOPS 1X. Los geles se lavaron durante 15 minutos en agua destilada y posteriormente se incubaron 30 minutos en SSC 10X cambiando el buffer cada 15 minutos.



El ARN se transfirió a una membrana de Nylon (*Hybond-N+*, *Amersham*) previamente incubada durante 5 minutos en agua destilada y 1 hora en SSC 10X. La transferencia se realizó por capilaridad durante 12-16 horas con tampón SSC 10X siguiendo el protocolo descrito por el fabricante de la membrana. Tras la transferencia, el ARN se fijó a la membrana con luz ultravioleta mediante dos pulsos de 70.000 mJ/cm<sup>2</sup> con un *UV Crosslinker* (*BIORAD*)

#### *K.4.1.1 Marcaje de las sondas*

Para el marcaje de las sondas se emplearon los siguientes moldes.

*Molde de SV*: Digestión del plásmido pT7 SV con *Pml* I (8067) y *Stu* I (8568) generando un fragmento de 500 pb. Detecta tanto el ARN genómico 49S como el subgenómico 26S.

*Molde de EGFP*: Digestión del plásmido pEGFP-N1(Dam-) con *Bam* HI y *Xba* I generando un fragmento de 750pb. Detecta la región del gen EGFP presente tanto en el ARN genómico, subgenómico como el ARN propio de EGFP.

*Molde de  $\beta$ -actina*: Amplificación por PCR con los oligonucleótidos *Actina F* (CTTCGCGGGCGACGATGC) y *Actina R* (TGGTGGTGAAGCTGTAGCC). Se amplificó un fragmento de 350 pb.

El marcaje con 20  $\mu$ Ci de [32P]-dCTP fue realizado sobre 50 ng de cada uno de los moldes con el *Amersham Rediprime™ II DNA Labeling System* siguiendo en todo momento las instrucciones del fabricante. Una vez finalizado el marcaje las sondas fueron purificas por cromatografía de exclusión molecular empleando columnas *CHROMA SPIN™*. La radiactividad incorporada en las sondas fue cuantificada con un contador de centelleo. Las concentraciones obtenidas fueron de  $9 \times 10^4$  -  $1 \times 10^5$  cpm/ $\mu$ l. Para cada hibridación se utilizaron  $2 \times 10^6$  cpm/hibridación.

#### *K.4.1.2 Hibridación y revelado:*

Todas las hibridaciones se realizaron con la solución *ExpressHyb TM de Clontech* durante 2 hora a 42°C siguiendo el protocolo de la casa comercial (*Clontech*) y utilizando las sondas descritas en el apartado anterior. Las membranas fueron introducidas en tubos de hibridación de vidrio donde se prehibridaron durante 30 minutos a 65°C en un horno de hibridación con rotor giratorio. Para la hibridación se retiró la solución utilizada y se añadió la sonda marcada con [<sup>32</sup>P]-dCTP (previamente desnaturalizada calentándola a 95°C) a 4 ml de solución de hibridación. Las membranas se hibridaron durante 2 h a 42°C en el horno de hibridación. La sonda no unida de manera específica a la membrana se eliminó mediante 2 lavados de 20 minutos a 42°C en la solución de lavado 1 (SSC 2x 0,05% de SDS). Posteriormente, se realizaron tres lavados más durante 40 minutos en la solución de lavado 2 (SSC 0,1x y SDS 0,1%) a temperatura ambiente. Las membranas se recubrieron rápidamente sin dejarlas secar con papel *saran wrap* y se colocaron en cassetes de exposición con pantallas intensificadoras (*Hypercasette, Amersham*) a -70°C el tiempo necesario.

### ***K.5 Ensayos de Actividad luciferasa***

#### *K.5.1 Obtención y preparación de las muestras*

##### *K.5.1.1 Muestras procedentes de cultivos celulares*

En el caso de cultivos celulares, éstos se infectaron con los virus correspondientes que expresaban el marcadore luciferasa y a las 6 hpi la monocapa se lavó con PBS para eliminar posibles restos de medio. La células fueron lisadas con 300 µl de buffer de lisis de luciferasa (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 15 mM, MgSO<sub>4</sub> 15 mM, EGTA 4 mM, DTT 4 mM y T-X100 1%). Los extractos se mantuvieron en hielo durante 10 minutos y posteriormente

fueron centrifugados a 10.000 xg durante 10 min a 4°C para eliminar los núcleos celulares y restos de membranas.

#### *K.5.1.2 Muestras procedentes de tejidos murinos:*

En el caso de animales infectados, los cerebros extraídos fueron homogeneizados de la misma manera que se realizó para la preparación de extractos para western blot. La actividad luciferasa fue medida directamente a partir del extracto crudo centrifugado.

#### *K.5.2 Medida de la actividad luciferasa*

A partir del sobrenadante se cuantificó la concentración de proteína total por el método de Bradford y se determinó la actividad luciferasa. Para medir dicha actividad se añadieron de 1 a 10 µl de sobrenadante en 300 µl de buffer de reacción (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 15 mM, MgSO<sub>4</sub> 15 mM, EGTA 4 mM, DTT 4 mM y ATP 2 mM) y 100 µl de luciferina 0,2 mM. Las medidas se realizaron en un luminómetro Sirius Single Tube (Berthold).

### ***K.6 Detección de apoptosis (TUNEL)***

Para la detección de las zonas de apoptosis en las secciones histológicas de los tumores empleamos el *In Situ Cell Death Detection Kit de Roche*. Sobre secciones de tumores desparafinadas (descrito en el apartado K.2.1.2.2), llevamos a cabo el proceso siguiendo en todo momento las indicaciones del producto. Para las dobles tinciones TUNEL+ SV-C, realizamos en primer lugar el TUNEL y seguidamente continuamos con el protocolo de IF para tejidos parafinados. (Descrito en el apartado K.2.2)

### ***K.7 Análisis informáticos***

Para predecir la estructura secundaria del ARN se emplearon programas de predicción de estructura secundaria disponibles en servidores de acceso libre (MFold y Pknots).

***K.8 Análisis estadísticos***

El análisis estadístico de los datos para determinar el grado de significación de las diferencias encontradas entre los distintos grupos se realizó mediante el test de análisis de varianza ANOVA. Se consideraron significativos los valores de  $p < 0,05$ .





# RESULTADOS

Los resultados que se describen en esta tesis están divididos en dos partes bien diferenciadas pero muy relacionadas entre sí. En la primera hemos analizado los cambios traduccionales que acontecen en las células infectadas con el virus Sindbis, tanto en células y tejidos en cultivo como en animales infectados. En la segunda parte, hemos estudiado cómo la interacción virus-hospedador a nivel traduccional está regulando el tropismo del virus. Todo ello nos ha conducido a empezar a evaluar las propiedades oncolíticas de un virus Sindbis y de un Alfavirus relacionado.

## ***A. REGULACIÓN DE LA TRADUCCIÓN DURANTE LA INFECCIÓN CON EL VIRUS SINDBIS***

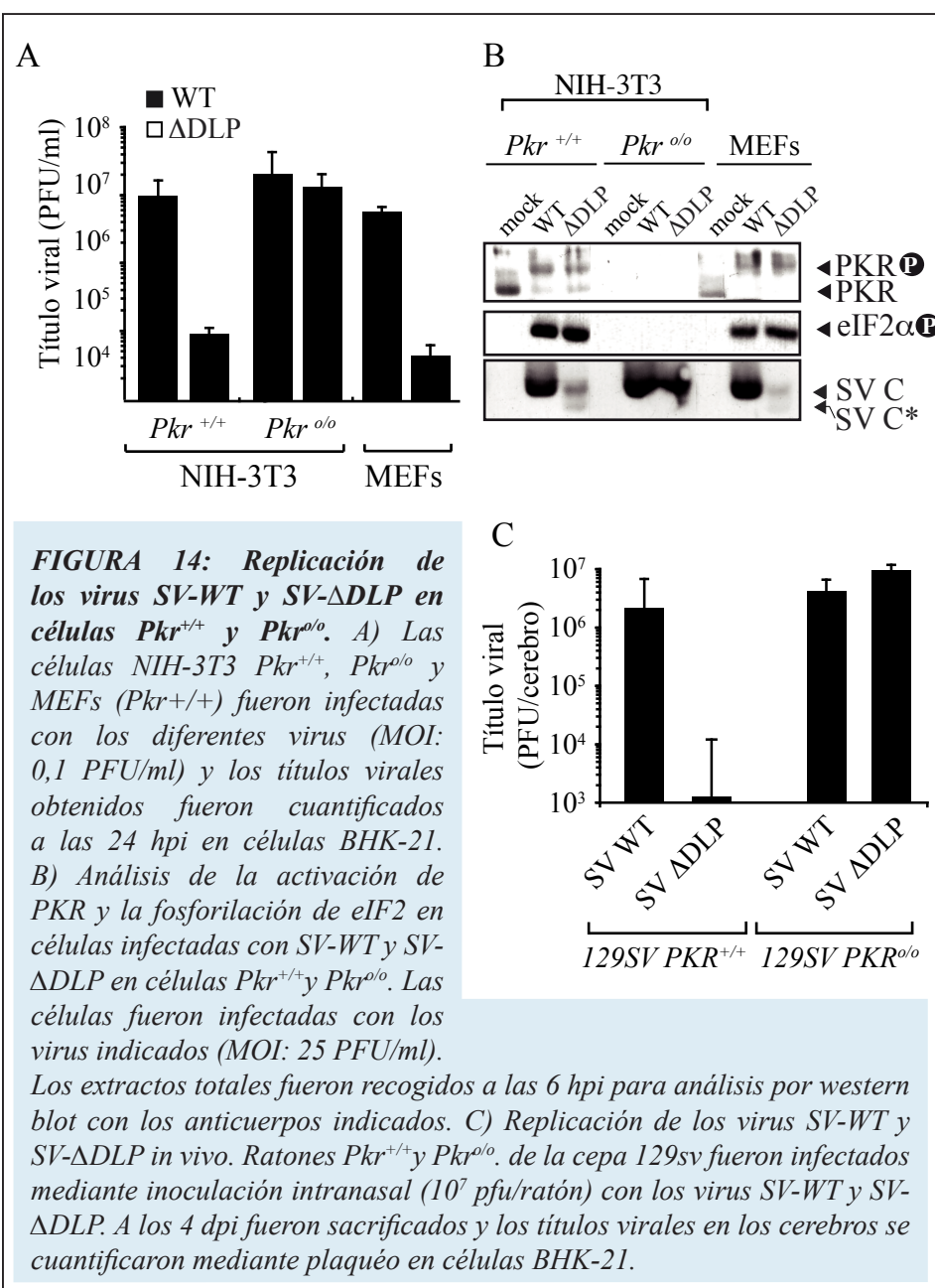
### ***A1. Importancia de la estructura DLP en la replicación viral in vitro e in vivo***

Trabajos previos de nuestro grupo han descrito la existencia de una región de aproximadamente 80 nts situada en el ARN 26S que confiere resistencia a la fosforilación de eIF2 en células en cultivo. Esta secuencia se encuentra situada por detrás del AUG iniciador, en región codificante, y forma una estructura secundaria conocida como DLP. La eliminación de esta estructura mediante mutagénesis dirigida dio lugar a un virus Sindbis

mutante (SV-ΔDLP) que vio muy disminuida su capacidad replicativa en células NIH-3T3 (Ventoso et al. 2006). Para evaluar en profundidad la importancia de la estructura DLP en la replicación del virus en animales, inoculamos ratones de la cepa 129sv con los virus WT y ΔDLP. Tras la infección se compararon los niveles de replicación obtenidos en los cerebros de los animales infectados con los obtenidos en células en cultivo.

Para evaluar la replicación del virus, analizamos con más detalle la replicación de los dos virus en células en cultivo. En primer lugar, se compararon los niveles de producción viral de ambos virus en células, NIH-3T3 normales ( $Pkr^{+/+}$ ), células derivadas de ratones deficientes en el gen *pkr* ( $Pkr^{o/o}$ ) y fibroblastos embrionarios primarios murinos (MEFs). El virus SV-ΔDLP replicó a niveles 2-3 logaritmos inferiores que el virus SV-WT en  $Pkr^{+/+}$ , mientras que en células  $Pkr^{o/o}$  los niveles de replicación fueron muy similares (**Fig. 14A**). Los resultados observados en MEFs son similares a los obtenidos en  $Pkr^{+/+}$ . La infección con ambos virus provocó la fosforilación masiva de eIF2α debido a la activación de PKR (**Fig. 14B**) tal y como se había descrito previamente (Ventoso et al. 2006). Esta activación se refleja en el western blot como un cambio de movilidad de la quinasa debido a la hiperfosforilación que sufre tras activarse (Dar et al. 2005). Además y como ya había sido descrito anteriormente, en células  $Pkr^{o/o}$  infectadas con SV no detectamos fosforilación de eIF2α. Esto nos permite afirmar que tras la infección con SV, la quinasa PKR es la principal responsable de la fosforilación de eIF2. Cuando comparamos la traducción de los ARNm 26S de estos virus en líneas celulares  $Pkr^{+/+}$  (NIH-3T3 y MEFs) y  $Pkr^{o/o}$  observamos una acusada disminución de la síntesis de proteínas estructurales del virus SV-ΔDLP en células  $Pkr^{+/+}$ , mientras que en células  $Pkr^{o/o}$  los niveles alcanzados fueron comparables al SV-WT. En estas células se observa un doblete de la proteína SV-C debido a la iniciación alternativa a partir del segundo o tercer AUG (**Fig. 14B**).

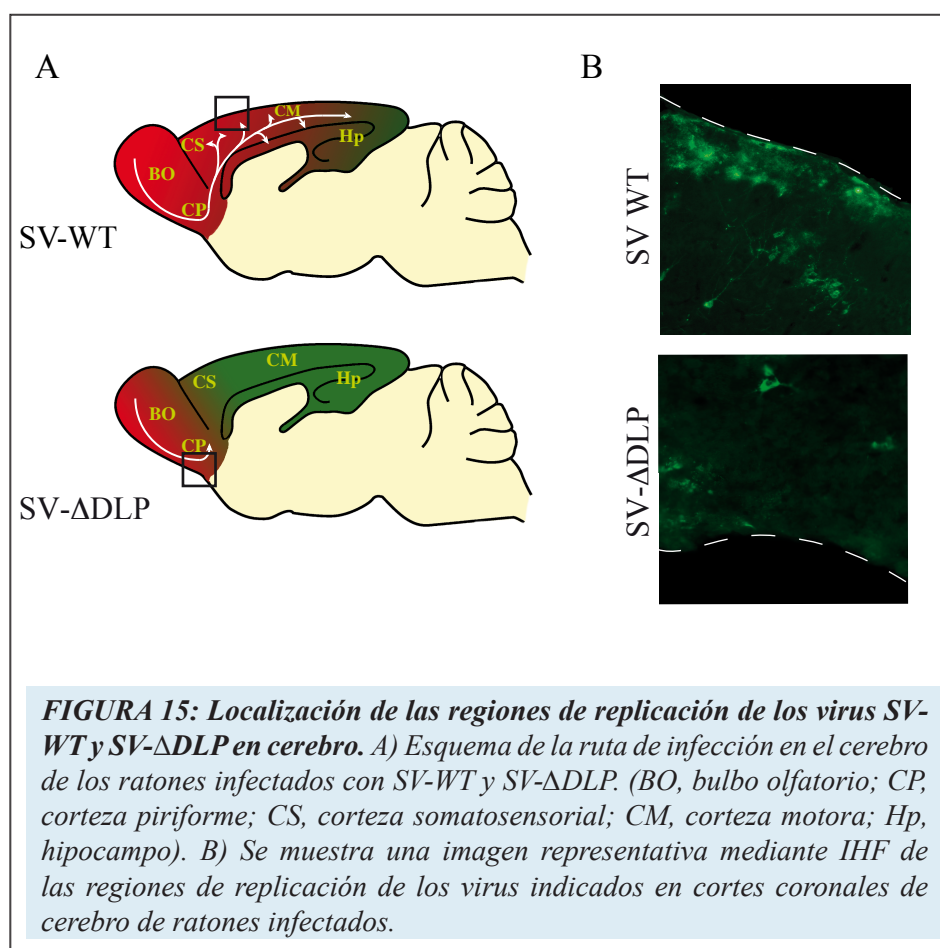


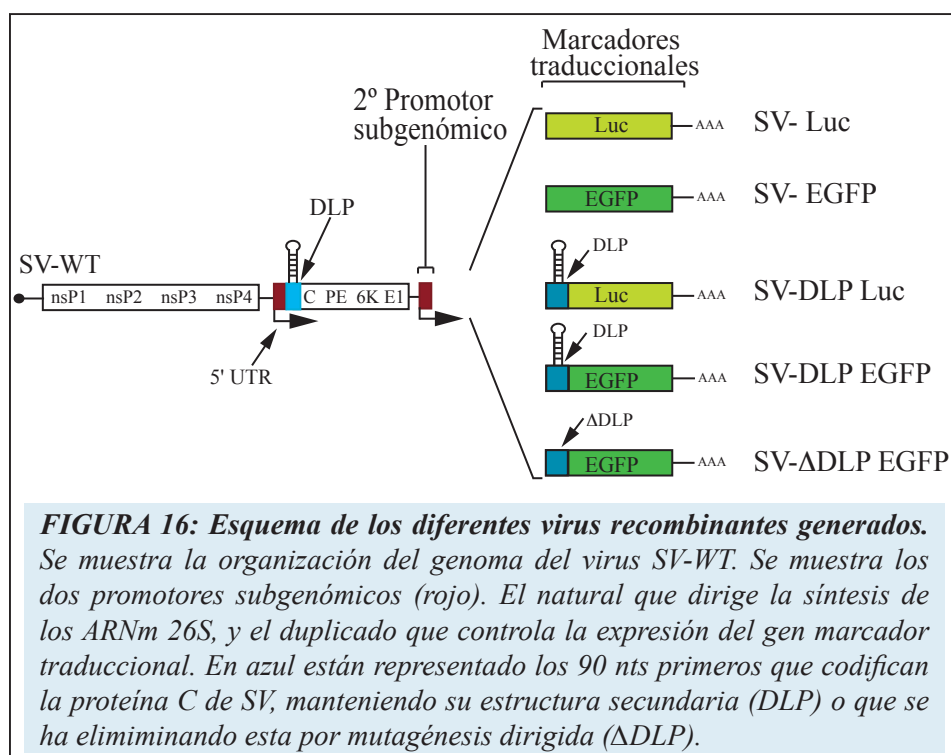


Un resultados similar, o incluso más acusado, se obtuvo en ratones. Los niveles de replicación detectados en cerebros de ratones salvajes (*Pkr*<sup>+/+</sup>) infectados con el virus mutante SV-ΔDLP fueron entre 3 y 4 logaritmos inferiores a los obtenidos con el virus SV-WT a todos

los tiempos de infección analizados, mientras que en ratones PKR<sup>o/o</sup> los niveles de replicación obtenidos con ambos virus fueron similares (**Fig. 14C**). Observamos que aunque la mayoría de los ratones salvajes infectados con el virus SV-ΔDLP mostraban unos niveles de replicación inferiores al límite de detección ( $10^2$  pfu), en algunos animales llegamos a detectar niveles entre  $10^3$  y  $10^4$  pfu por cerebro, lo que indica que la replicación del virus mutante se encuentra muy disminuida pero no completamente abolida. Por otra parte el virus SV-WT alcanzó niveles de replicación similares en ambos tipos de animales.

Con la intención de obtener información anatómica de los sitios



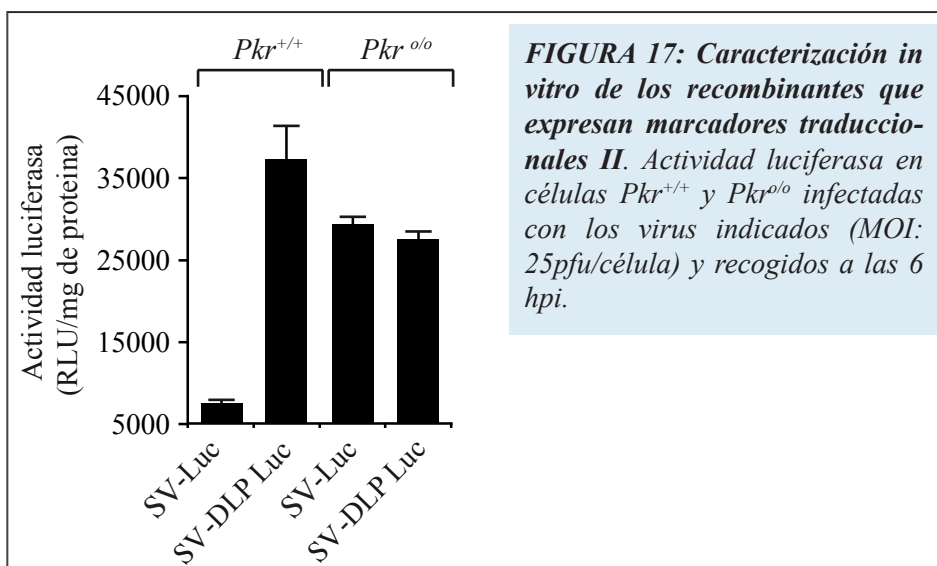


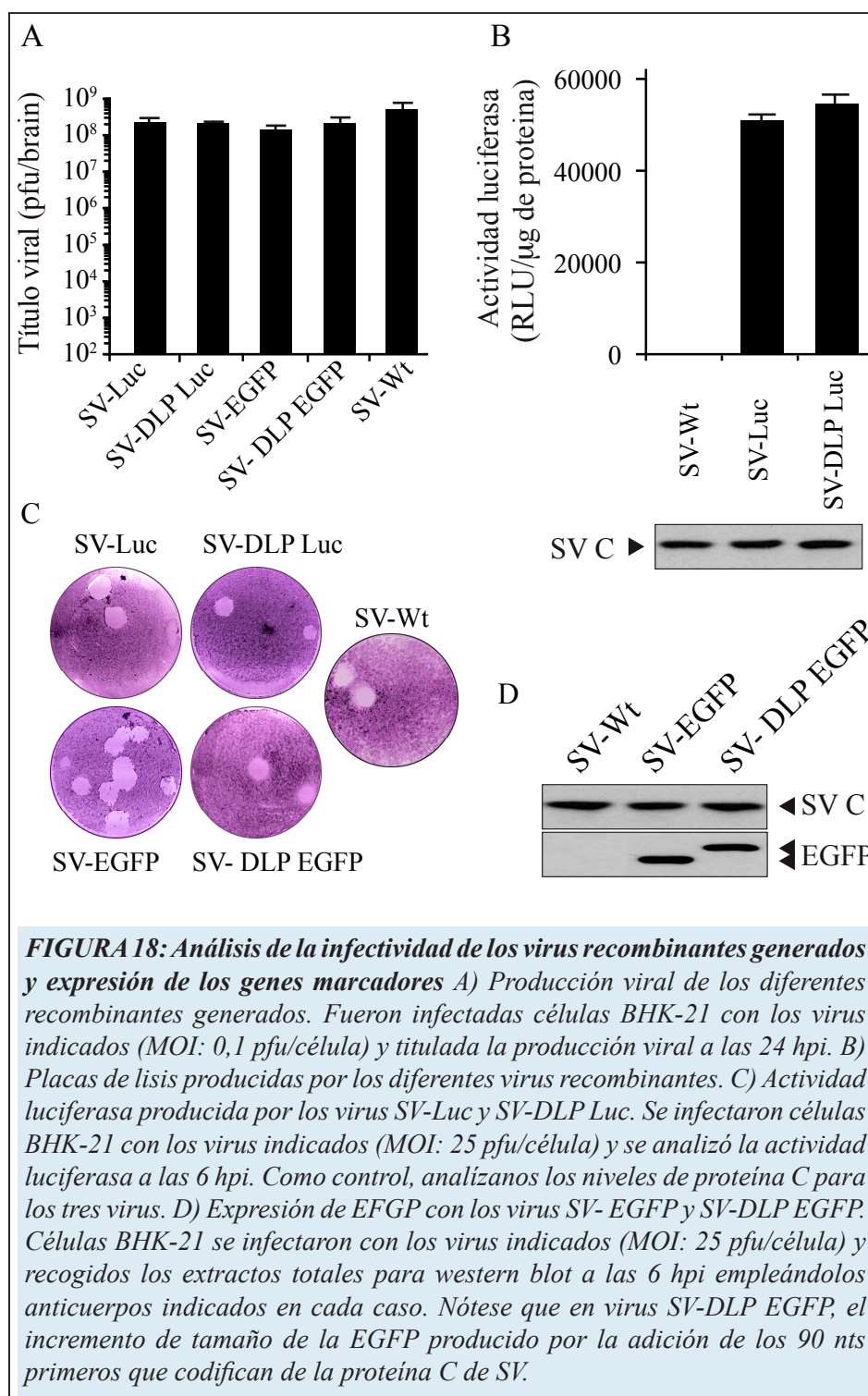
de replicación de los dos virus, analizamos por IHF cortes sagitales y coronales de cerebros de ratones infectados por vía intranasal a los 5 dpi (**Fig. 15B**). Observamos que el virus SV-WT produce focos de replicación constituidos por decenas de neuronas infectadas con aspecto piramidal y que se encuentran diseminados por toda la corteza cerebral. Detectamos replicación del virus SV salvaje en corteza piriforme (especialmente a tiempos cortos de infección), motora, somatosensorial así como en regiones del hipocampo. Sin embargo una menor (pero no nula) replicación se observó en los cerebros infectados con el virus mutante. Sólo detectamos replicación del virus mutante en neuronas aisladas de la corteza piriforme y en regiones más ventrales del cerebro (**Fig. 15A**). Este resultado demuestra la importancia de la estructura DLP en la resistencia traduccional del virus Sindbis que permite la replicación de este virus en ratones.

## A2. Generación de virus recombinantes con marcadores traduccionales

### A2.1. Caracterización de los virus recombinantes generados

Para estudiar mejor la traducción en células infectadas con el virus Sindbis *in vitro* e *in vivo*, construimos recombinantes del virus Sindbis con la capacidad de expresar ARNm heterólogos como marcadores (EGFP y Luciferasa). Para ello, las secuencias codificantes de los genes EGFP y Luciferasa fueron clonadas bajo el control de un segundo promotor subgenómico del virus en el plásmido pT7-SV2p (Hahn et al. 1992) dando lugar a los virus recombinantes SV-EGFP y SV-Luc. Dado que los ARNm subgenómicos del virus Sindbis presentan la estructura DLP y ésta confiere resistencia traduccional a los ARNm 26S, pensamos que esta estructura podría también conferir esta propiedad a un ARNm heterólogo (**Fig. 16**). Para ello se clonaron los primeros 140 nts del ARNm 26S que contiene el DLP delante de las regiones codificantes de los genes marcadores (respetando la fase de lectura). De esta forma obtuvimos los virus SV-DLP EGFP y SV-DLP Luc. En primer lugar comprobamos la infectividad de los virus recombinantes en células BHK-21. Infectamos a baja multiplicidad





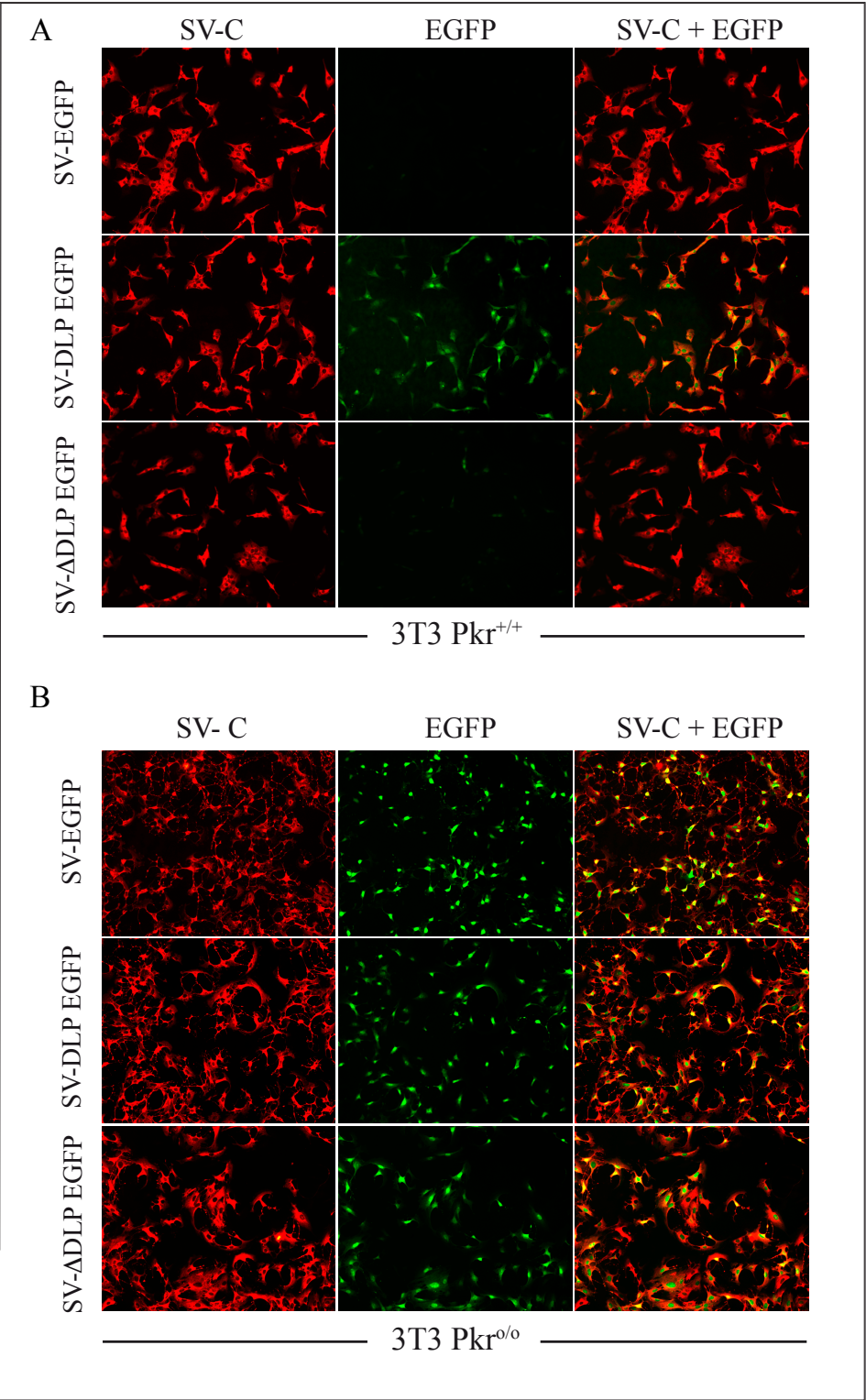
(MOI 0.1) en BHK-21 observando un claro efecto citopático (ECP) en las células infectadas a las 24 hpi. No se observaron diferencias en el tiempo de aparición del ECP comparado con el virus SV-WT. Los títulos obtenidos ( $10^8$  pfu/ml) fueron similares a los obtenidos para el virus parental del que proceden (**Fig. 18A**). Además, las placas de lisis obtenidas fueron indistinguibles de las generadas por el virus parental, lo que demuestra que la capacidad replicativa del virus no se ve afectada por la introducción de los marcadores traduccionales (**Fig. 18C**).

A continuación comprobamos que todos los virus recombinantes expresaban los genes marcadores en células BHK-21. La actividad luciferasa obtenida a las 6 hpi fue similar para ambos virus (**Fig. 18B**). Para el caso de los virus que expresan EGFP, observamos que tanto el SV-EGFP como el SV-DLP EGFP expresaron EGFP a niveles similares. El tamaño de la proteína EGFP sintetizada por el virus SV-EGFP fue sensiblemente mayor tal y como cabría esperar debido a la presencia de la región DLP que incluye (**Fig. 18D**). Mediante IF y dilución límite comprobamos que las preparaciones de virus recombinantes eran muy homogéneas desde el punto de vista genético, ya que entre un 85-90% de los virus infecciosos expresaban el marcador (Ver detalles en Materiales y Métodos).

#### *A2.2. Regulación traduccional en células en cultivo*

A continuación estudiamos el comportamiento traduccional de los ARNm marcadores de los virus recombinantes en NIH-3T3  $Pkr^{+/+}$  y  $Pkr^{o/o}$ . Tras la infección con los virus SV-EGFP y SV-Luc, tanto la síntesis de EGFP como de Luciferasa se vio fuertemente bloqueada en células 3T3

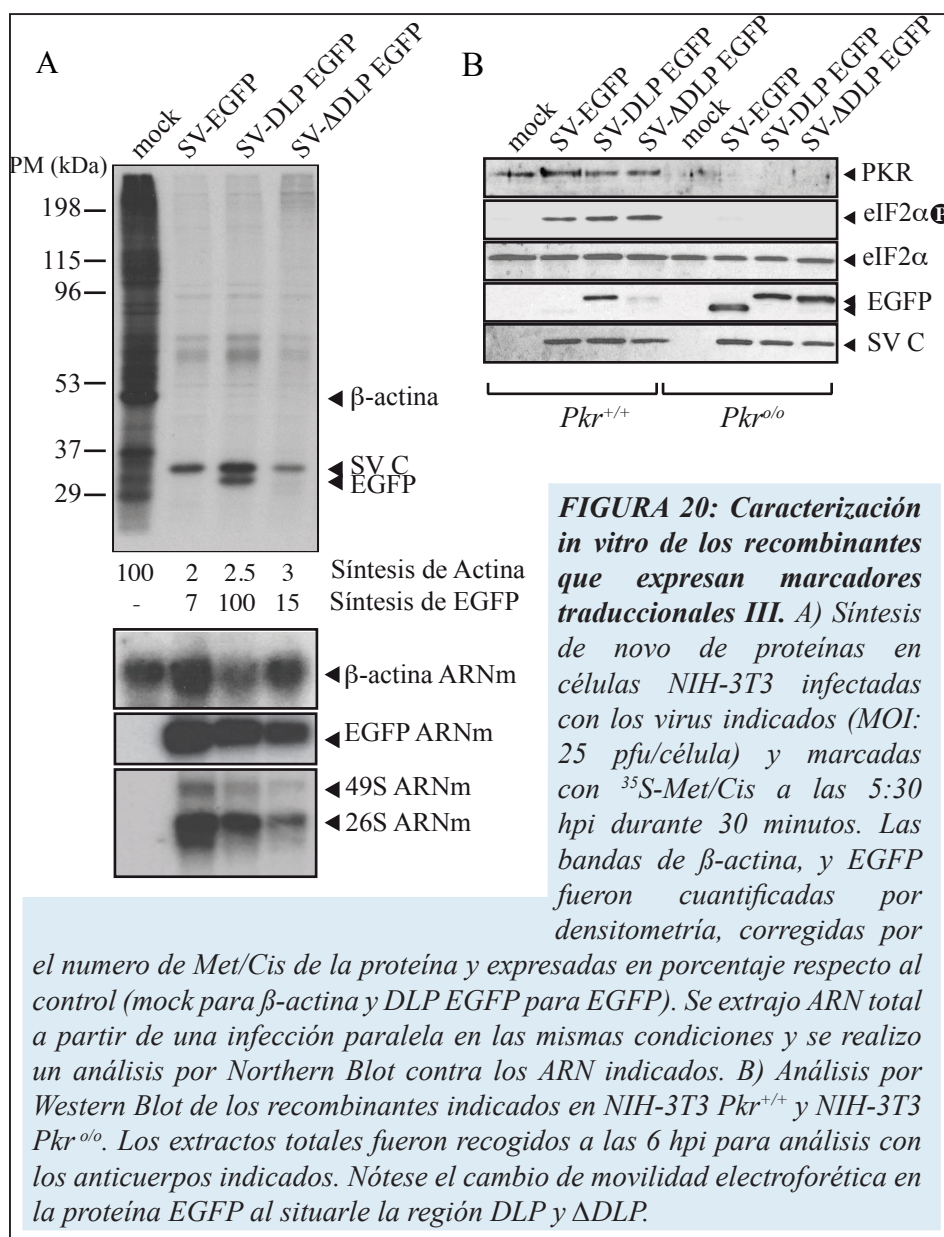
**FIGURA 19: Caracterización in vitro de los recombinantes que expresan marcadores traduccionales I.** Inmunofluorescencia a las 6 hpi sobre células NIH-3T3  $Pkr^{+/+}$  y NIH-3T3  $Pkr^{o/o}$  infectadas con los virus indicados (MOI: 25 pfu/célula).



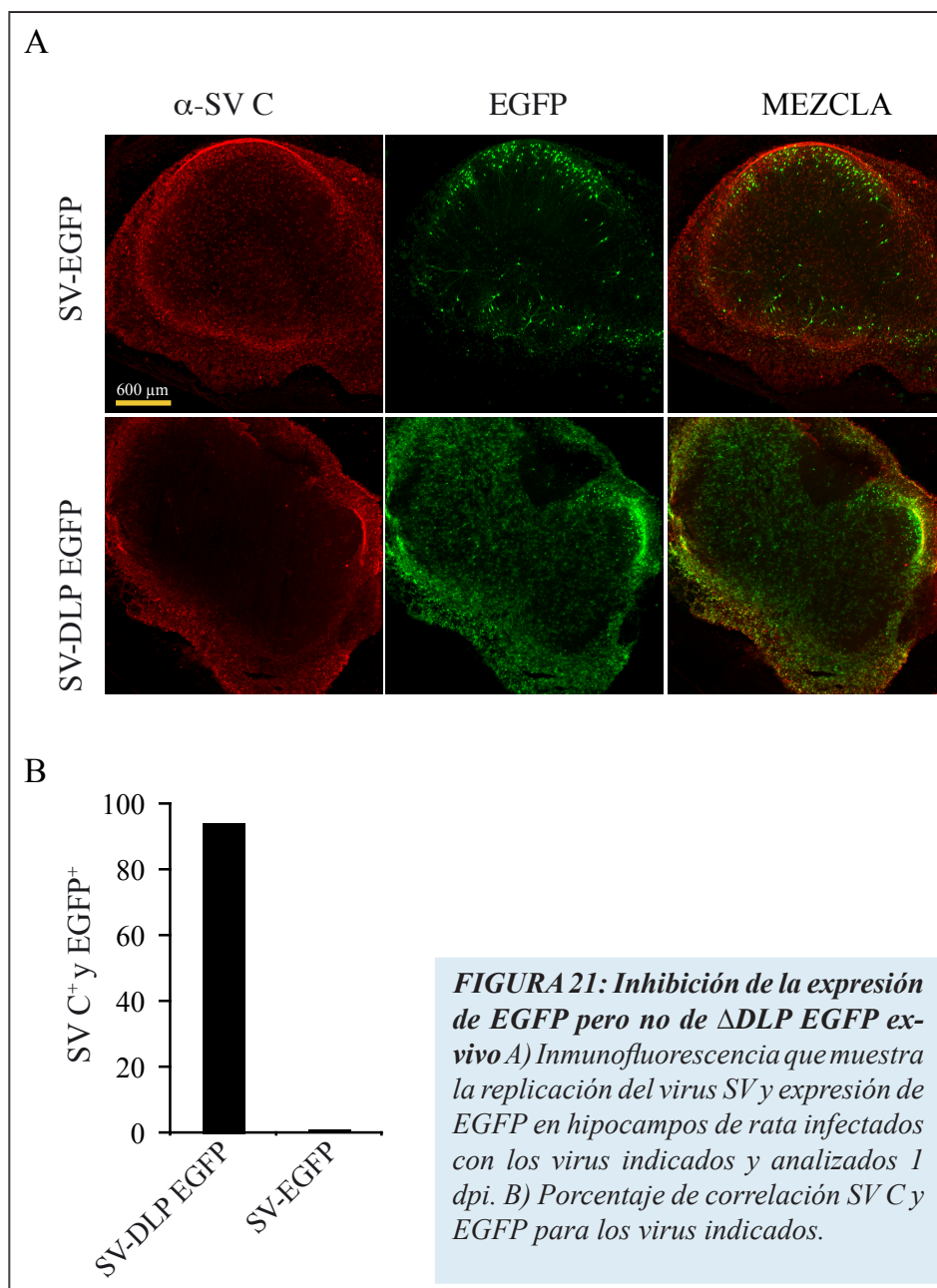


Pkr<sup>+/+</sup>. La presencia de la estructura DLP en los genes marcadores de los virus SV-DLP EGFP y SV-DLP Luc permitió la recuperación de la síntesis de los marcadores hasta obtener unos niveles de síntesis de EGFP y Luciferasa elevados y comparables a los que se obtienen en células Pkr<sup>0/0</sup> infectadas, donde no se observó fosforilación del factor eIF2 tal y como ya habíamos descrito anteriormente (Ventoso et al. 2006) (**Fig. 17 y 19**). Estas diferencias están indicando que la activación de PKR y la posterior fosforilación de eIF2 $\alpha$  en células infectadas con Sindbis provocan el bloqueo de la traducción de ARNm no virales que carezcan de la estructura DLP. Quisimos comparar el comportamiento traduccional de estos ARNm marcadores con el de la mayoría de los ARNm celulares que ven inhibida su traducción debido a la fosforilación de eIF2 en las células infectadas. Para ello, y en primer lugar, analizamos la síntesis de proteínas *de novo* mediante marcaje metabólico con [35S]-Met/Cis en células infectadas con SV-EGFP y SV-DLP EGFP (**Fig. 20A**). Observamos que la síntesis de DLP EGFP fue comparable a la síntesis de las proteínas propias del virus (cápsida), mientras que la síntesis de EGFP se inhibió de manera comparable al resto de las proteínas de la célula. El análisis densitométrico de las bandas de EGFP, SV-C y  $\beta$ -actina confirmó este resultado. Para descartar que estas diferencias pudieran deberse a diferencias en los niveles de transcripción de los ARNm de los genes marcadores y de  $\beta$ -actina, llevamos a cabo un Northern-blot empleando sondas frente a EGFP,  $\beta$ -actina y 26S ARNm. No encontramos diferencias significativas en la acumulación de ARNm de EGFP en células infectadas con SV-EGFP y SV-DLP EGFP ni tampoco en los niveles de ARNm de  $\beta$ -actina entre células control sin infectar y células infectadas con ambos virus. Para confirmar que el efecto producido por la inserción de los primeros 140 nts del ARNm viral 26S sobre la traducción del ARNm de EGFP era debido a la estructura secundaria DLP, analizamos la expresión del virus SV- $\Delta$ DLP EGFP, en donde la estructura



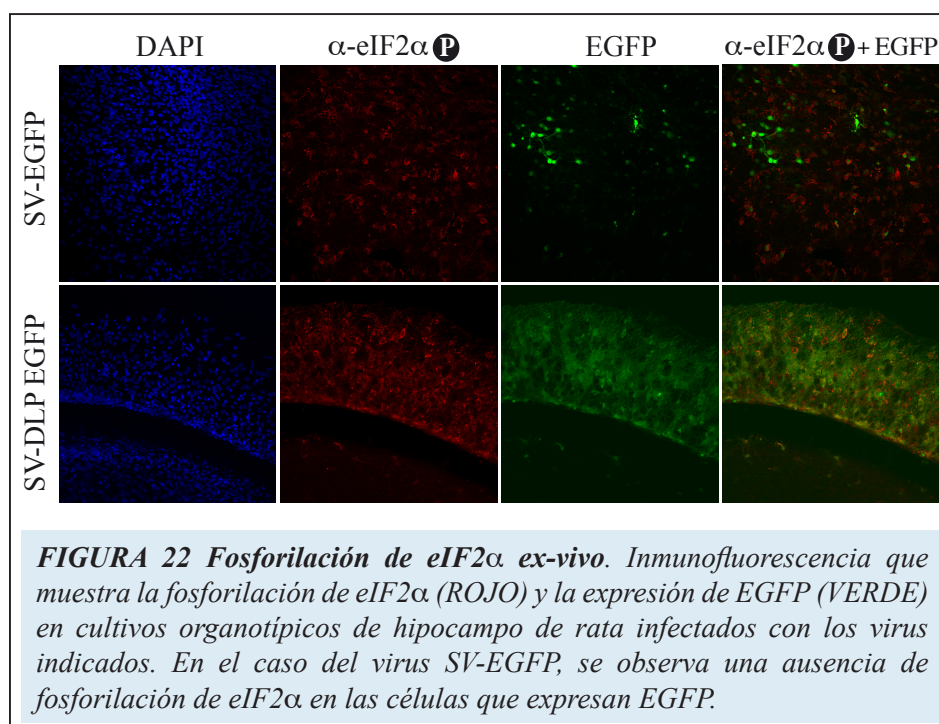


secundaria del DLP ha sido desestabilizada mediante mutagénesis dirigida. El comportamiento de este virus en cuanto a la expresión de EGFP fue muy similar a la obtenida con el virus SV-EGFP, lo que demuestra que es la estructura secundaria DLP, y no la secuencia que se añade a la proteína, la responsable de la resistencia traduccional a la fosforilación de eIF2.



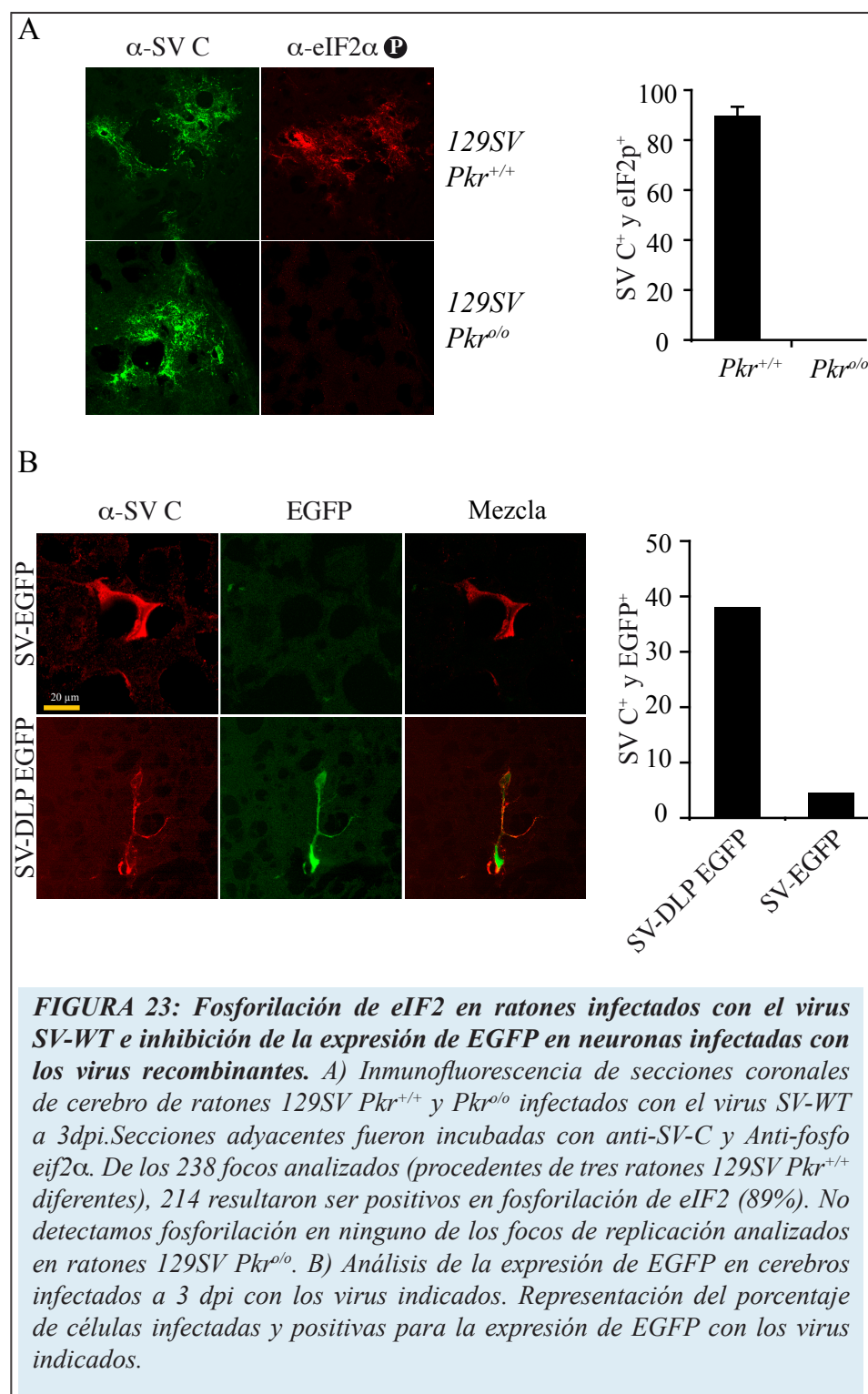
### A2.3. Regulación traduccional ex-vivo.

Nuestro siguiente paso fue estudiar el comportamiento de los marcadores traduccionales en un sistema más complejo y fisiológico. Los



cultivos organotípicos, o explantes, constituyen un modelo muy útil para el estudio electrofisiológico del tejido nervioso ya que conservan bastante bien la neuroanatomía, conexiones y relaciones neurona-glia siempre y cuando se mantengan bajo condiciones precisas de temperatura regulada y oxigenación permanente. Además, habían sido empleados con éxito en la transducción de genes empleando vectores derivados de Alfavirus (Ehrengruber et al. 1999) con lo cual decidimos usarlos en este estudio.

Fueron extraídos explantes de hipocampo de rata los cuales infectamos con los virus SV-EGFP y SV-DLP EGFP. En primer lugar analizamos la cinética de replicación de los virus mediante inmunofluorescencia frente a la cápsida de SV. Ambos virus recombinantes se propagaron rápidamente por el tejido, de manera que a las 24 hpi observamos un gran número de neuronas infectadas, principalmente de aspecto piramidal muy parecidas a las observadas en los cerebros de

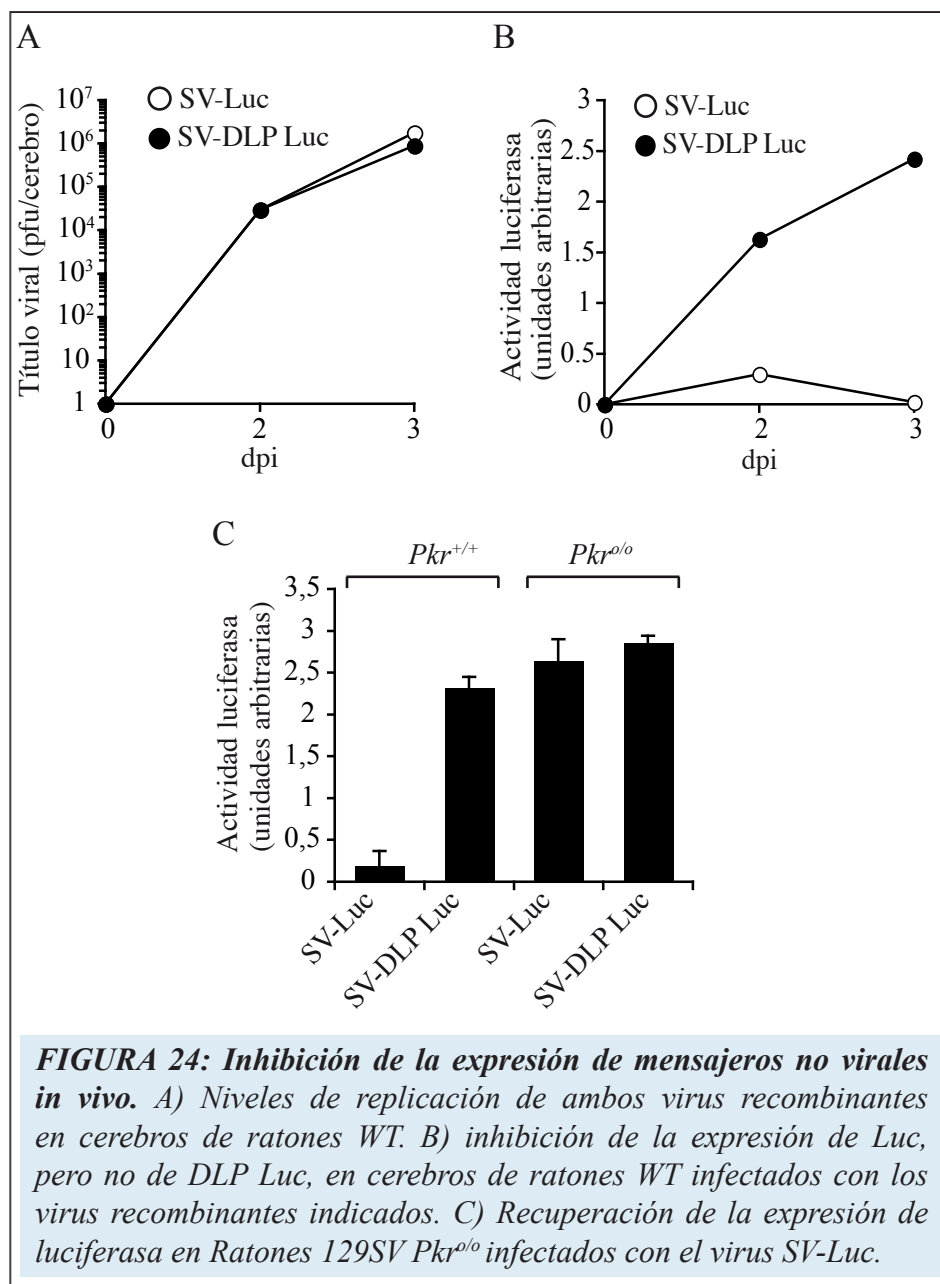


ratones infectados con SV. Además, a diferencia de los cortes coronales de los cerebros de los ratones infectados, en los explantes lográbamos visualizar la morfología completa de muchas de las neuronas infectadas debido al grosor (aprox. 300 micras) del tejido.

Cuando estudiamos la expresión de EGFP, observamos una clara diferencia en cuanto a número e intensidad de células que expresan EGFP entre los explantes infectados con los virus SV-EGFP y SV-DLP EGFP. Mientras que en los explantes infectados con el virus SV- DLP EGFP el 94% de las neuronas infectadas expresaban niveles elevados de EGFP, solo el 2% de las neuronas infectadas con el SV-EGFP expresaron niveles detectables de EGFP (**Fig. 21**). También analizamos la fosforilación de eIF2 en los explantes infectados con ambos virus y observamos una prominente señal de fosfo-eIF2 que coincidía exactamente con las células infectadas tras la infección con SV. Al estudiar con más detalle (célula a célula) la expresión de EGFP y la fosforilación del factor eIF2, encontramos un hecho destacable. Las pocas neuronas infectadas con el virus SV-EGFP en la que fuimos capaces de detectar una expresión clara de EGFP (aproximadamente el 2% de las infectadas) no mostraron fosforilación de eIF2. Sin embargo, la expresión de EGFP en los explantes infectados con SV-DLP EGFP fue independiente de la presencia o ausencia de eIF2 fosforilado (**Fig. 22**). Este hecho constata una vez más la sensibilidad de los ARNm no virales a la fosforilación de eIF2.

#### *A2.4. Estudio de la regulación traduccional in vivo*

Nuestros datos indicaban que los marcadores traduccionales que habíamos diseñado para nuestros virus recombinantes mimetizaban de forma muy fidedigna el comportamiento de los ARNm virales y celulares en cuanto a la traducción en la célula infectada se refiere. Este hecho ofrecía la posibilidad de usar estos virus para comprobar si el bloqueo



de la traducción de los ARNm no virales ocurre en animales infectados, simplemente comparando la expresión de los marcadores sensibles y resistentes a la fosforilación del eIF2. Para ello, y en primer lugar, analizamos la fosforilación de eIF2 en ratones salvajes y  $Pkr^{0/0}$  infectados con el virus



SV salvaje. Tras la inoculación intranasal, analizamos por IHF cortes coronales de cerebro a los 3-4 dpi. Observamos que la señal del anticuerpo anti-fosfo eIF2 apareció sólo en las regiones de replicación viral en animales  $Pkr^{+/+}$ . Más del 95% de las regiones de replicación presentaron reactividad frente al anticuerpo anti-eIF2 (**Fig. 23A**). Esta señal de fosforilación no se observó en animales  $Pkr^{o/o}$  infectados con el virus SV, lo que demuestra que al igual que ocurre *in vitro* y ex-vivo, los animales infectados con el virus SV responden a la infección activando PKR y fosforilando el factor eIF2. Estos resultados muestran que en animales infectados con el virus SV también se produce la inactivación del factor eIF2 por fosforilación. A continuación infectamos ratones salvajes y  $Pkr^{o/o}$  por vía intranasal con los virus SV-EGFP y SV-DLP EGFP y comparamos los niveles de replicación, expresión de EGFP y fosforilación de eIF2 en los cerebros. Al analizar el marcaje contra antígenos virales por IHF, no observamos diferencias en los niveles de replicación entre ambos virus. Sin embargo, sólo detectamos expresión de EGFP en los animales infectados con el virus SV-DLP EGFP (en el 50% de las células que expresaban antígenos virales) (**Fig. 23B**). Además, al igual que ocurrió con los animales infectados con el virus SV salvaje, las regiones que expresaban antígenos virales también mostraban marcaje positivo frente al anticuerpo anti-fosfo eIF2. En ratones  $Pkr^{+/+}$  infectados con el virus SV-EGFP sólo un 5 % de las células infectadas con el virus mostraron expresión de EGFP. Sin embargo, en ratones  $Pkr^{o/o}$  los niveles de expresión de EGFP fueron similares en los dos virus recombinantes. Un resultado equivalente al obtenido para el virus SV-EGFP se obtuvo cuando se empleó el virus SV-ADLP EGFP. Para tener una idea más cuantitativa del nivel de *shut off* traduccional en los animales infectados con SV, medimos la actividad luciferasa en cerebros de animales  $Pkr^{+/+}$  y  $Pkr^{o/o}$  infectados por vía intranasal con los virus SV-Luc y SV-DLP Luc. Sólo detectamos actividad luciferasa en los ratones  $Pkr^{+/+}$  infectados

con el virus SV-DLP Luc a pesar de que los niveles de replicación fueron idénticos para ambos virus (**Fig. 24A/B**). Al comparar estos datos con los obtenidos en cultivos celulares concluimos que el *shut off* parece incluso más intenso que el observado *in vitro*. Cuando se analizaron los niveles de actividad luciferasa en ratones Pkr<sup>0/0</sup> no se observaron diferencias significativas entre los virus SV-Luc y SV-DLP Luc (**Fig. 24C**).

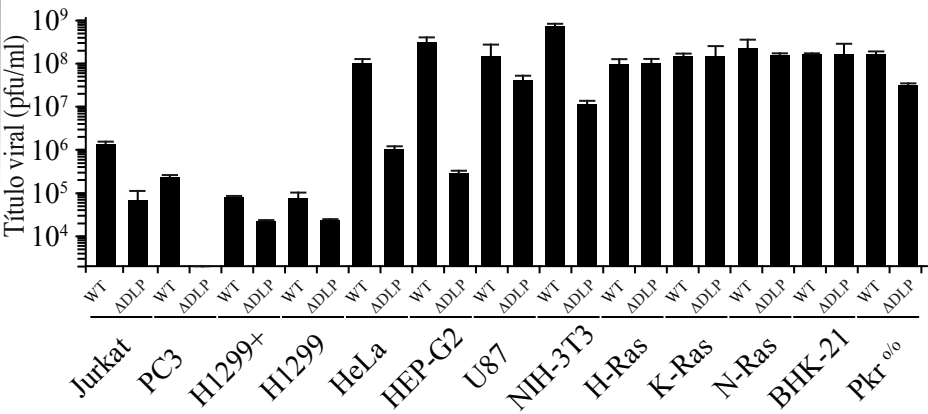
### ***B. REGULACIÓN TRADUCCIONAL Y TROPISMO VIRAL. IMPLICACIONES EN EL DESARROLLO DE VIRUS SINDBIS Y DERIVADOS CON ACTIVIDAD ONCOLÍTICA.***

El hecho de que la replicación del virus mutante fuese tan baja, pero no nula, sugería la existencia de un pequeño grupo de neuronas del cerebro de ratón incapaces de activar PKR y fosforilar eIF2 en respuesta a la infección, permitiendo de este modo la replicación del virus mutante a un nivel bajo. La pérdida de respuesta innata frente a las infecciones virales es una característica bastante general de las células transformadas, que suelen ser refractarias al efecto antiviral de los interferones (Elankumaran et al 2010. , Stark et al. 1998). Además, en ciertos tipos de tumores linfáticos y en células transformadas con los oncogenes Ras, se ha descrito tanto la pérdida de expresión como la pérdida de actividad de la quinasa PKR (Hii et al. 2004). Estas observaciones nos condujeron a pensar que tal

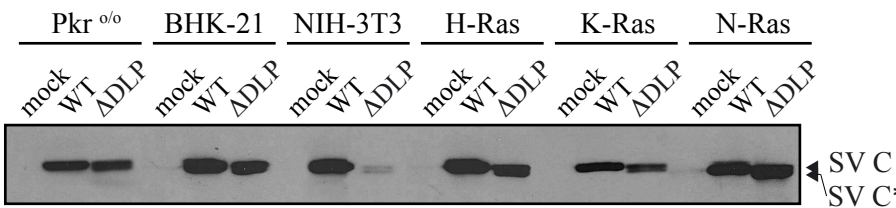
**FIGURA 25:** A) Niveles de replicación del virus SV-WT y SV-DDLP en diferentes líneas celulares transformadas y tumorales. B) Niveles de replicación de los diferentes virus (MOI: 25pfu/célula) en las líneas celulares indicadas en función de la producción de proteína C. Se observa en el virus SV-ΔDLP la presencia de un doblete producido por la iniciación en un segundo ATG. C) Niveles de luciferasa obtenidos con los diferentes virus (MOI: 25pfu/célula) en las líneas celulares indicadas y recogidos a las 6 hpi.



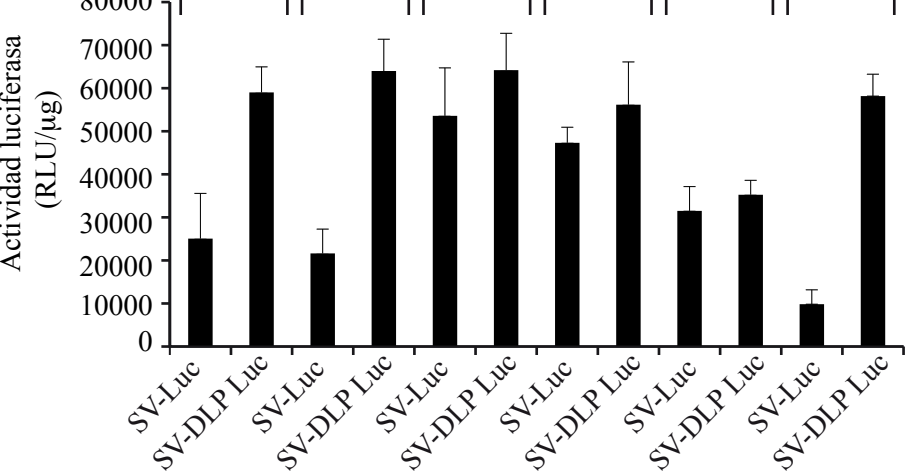
A



B



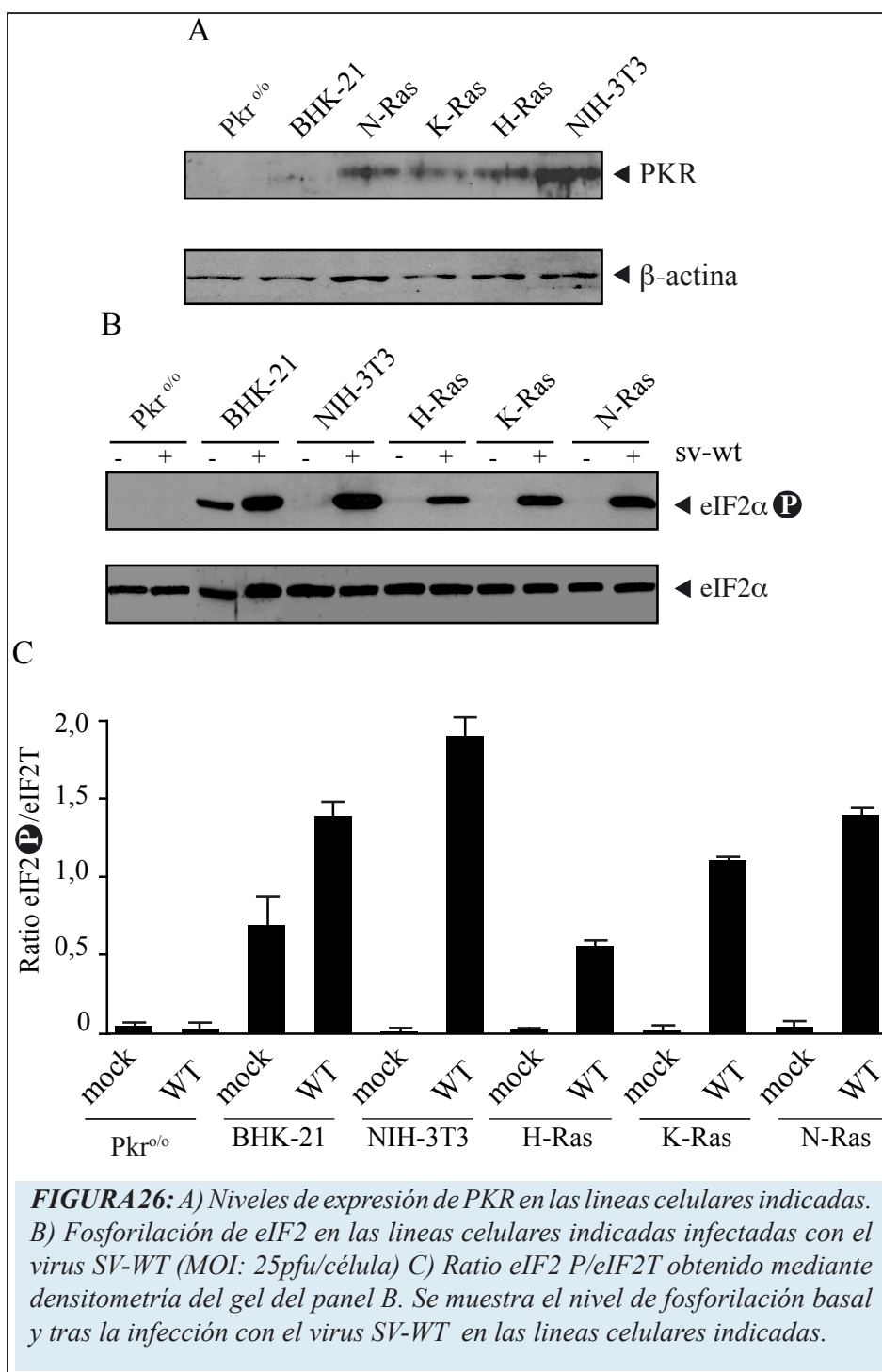
C



vez la adquisición de la estructura DLP en los Alfavirus vino asociada a la capacidad del virus de infectar células bien diferenciadas (como las neuronas piramidales) de los vertebrados, mientras que en otros tipos celulares menos diferenciados como las células tumorales la función de la estructura DLP quizás fuese prescindible.

### ***B.1 Replicación del virus SV-WT y SV-ΔDLP en líneas celulares transformadas y de origen tumoral***

Para testar el posible oncotropismo del virus SV-ΔDLP, decidimos evaluar la capacidad replicativa diferencial en diferentes líneas tumorales. En primer lugar realizamos un estudio de producción viral en una colección de líneas celulares tumorales de origen humano y líneas murinas transformadas (**Fig. 25A**). En algunas de las líneas celulares estudiadas como PC3, H1299+, H1299- y Jurkat no detectamos niveles de replicación eficientes ni del virus SV-WT ni del virus mutante SV-ΔDLP, lo que indica que estas líneas celulares carecen de algún elemento esencial para la replicación del virus, ya sea a nivel de entrada en la célula o en la replicación. En otro grupo de líneas células entre la que se encuentran HeLa y Hep-G2, el virus SV salvaje replicó a niveles elevados ( $> 1 \times 10^8$  pfu/célula) y el SV-ΔDLP lo hizo a niveles mucho más bajos, entre 2 y 3 log. menores. Estos resultados son muy similares a los que se obtienen en células normales de ratón NIH-3T3, lo que indica que en las células HeLa y Hep-G2 la respuesta al virus a través de la fosforilación de eIF2 está intacta. Sin embargo, en otro grupo de líneas formado por BHK-21, U87 y 3T3 transformadas con los oncogenes *Ras* (H-Ras, K-Ras y N-Ras), pudimos observar que el virus mutante fue capaz de replicar a niveles sorprendentemente altos y similares al virus salvaje, llegando a obtenerse títulos superiores a  $1 \times 10^8$  pfu/célula.



*B.1.1 Estudio detallado de la replicación de SV-WT y SV-ΔDLP en células BHK-21 y NIH-3T3 transformadas con Ras.*

Estos resultados sugerían la existencia de algún tipo de desregulación traduccional en estas líneas que permitían la replicación del virus SV-ΔDLP. Por ello decidimos profundizar algo más en la respuesta de estas líneas celulares a la infección. En primer lugar estudiamos la síntesis de las proteínas estructurales (cápsida) mediante western-blot tanto para el virus SV-WT como SV-ΔDLP. Los niveles de acumulación de proteína de la cápsida en células BHK-21 y en las células transformadas con Ras fue similar para los dos virus, lo que contrasta claramente con lo observado en células NIH-3T3 no transformadas y en células primarias (MEFs) (**Fig. 25B**). El comportamiento de estos virus fue similar al obtenido en células Pkr<sup>o/o</sup>, por lo que el siguiente paso fue analizar los niveles de la quinasa PKR y la fosforilación de eIF2α en BHK-21 y en las NIH-3T3 transformadas con las tres isoformas del oncogén Ras. Tal y como se muestra en la figura 26 B-C, las células transformadas con H-Ras, K-Ras y N-Ras muestran unos niveles de fosforilación del factor eIF2α ligeramente inferiores a los observados en células NIH-3T3. No fuimos capaces de detectar PKR en células BHK-21 ni en células procedentes de ratones *knock out* para la proteína PKR tal y como cabría esperar (**Fig. 26A**).

*B.1.2 Niveles de fosforilación en células BHK-21 y NIH-3T3 transformadas con Ras infectadas con SV*

En cuanto a la fosforilación del factor eIF2 en células infectadas con el virus SV, cuantificamos los niveles de la forma fosforilada y los normalizamos por la cantidad total del factor para cada una de las líneas infectadas. En BHK-21 los niveles de fosforilación del factor eIF2 apenas se incrementaron con la infección en comparación con NIH-3T3. Este hecho podría explicar la eficiencia con la que el virus SV-ΔDLP es capaz

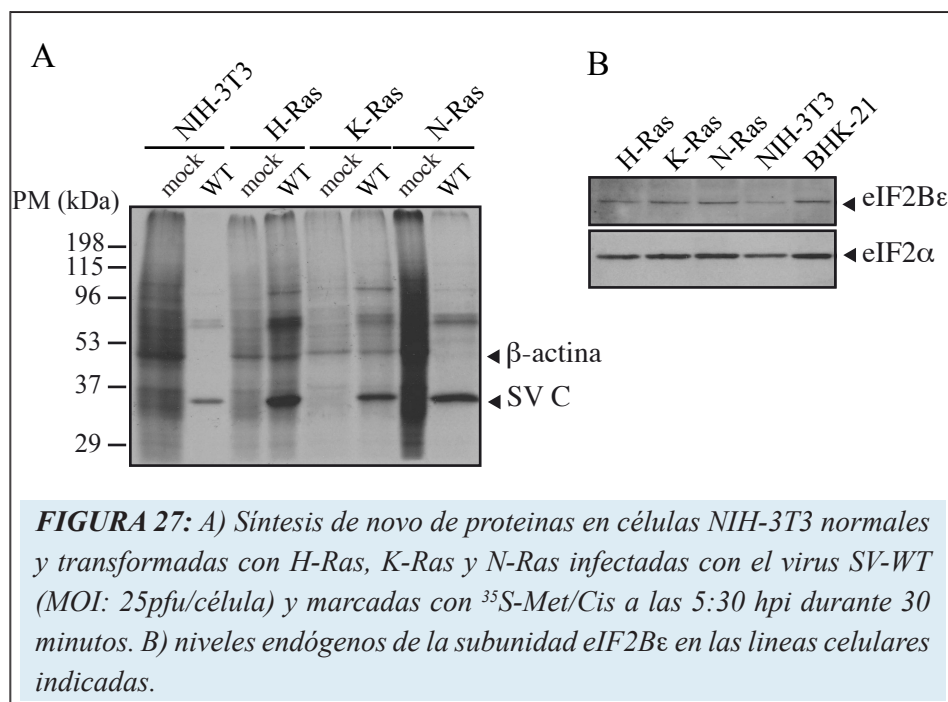
de de traducir en estas células. En las K-Ras y N-Ras, sin embargo, los niveles de fosforilación del factor eIF2 en respuesta a la infección fueron comparables a los observados en NIH-3T3. En las H-Ras se observó una fosforilación sustancialmente menor (**Fig. 26B/C**). A pesar de ello, el virus mutante fue capaz de traducir a niveles comparables al virus SV-WT en K-Ras y N-Ras, lo que sugiere la existencia de una desregulación en estas células que no opera directamente sobre la fosforilación del factor eIF2 y que permite la replicación del virus SV-ΔDLP en estas células.

#### *B.1.3 Actividad luciferasa de los virus SV-Luc y SV-DLP Luc en células BHK-21 y NIH-3T3 transformadas con Ras.*

Para confirmar que las líneas BHK-21 y 3T3 transformadas con Ras presentaban una desregulación traduccional en respuesta a la infección, comparamos los niveles de actividad luciferasa en células infectadas con los virus SV-Luc y SV-DLP Luc. Como se observa en la figura 25 C, no hallamos diferencias sustanciales ( superiores a 3 veces) en la expresión de luciferasa entre los dos virus en estas líneas celulares cuando se compararon con NIH-3T3 ( hasta 6 veces más luciferasa en el virus SV-DLP Luc).

#### *B.1.4 Análisis de los niveles de eIF2B $\epsilon$ y síntesis de novo de proteínas en células BHK-21 y NIH-3T3 transformadas con Ras infectadas con SV.*

Para arrojar un poco más de luz en esta aparente discrepancia, nos planteamos que tal vez la desregulación en las células transformadas con Ras operaba por debajo de la fosforilación de eIF2 $\alpha$ . El recambio del factor eIF2-GDP lo lleva a cabo el factor eIF2B, un complejo intercambiador de nucleótidos de guanina específico de eIF2. Un incremento en los niveles de eIF2B provoca un incremento en la velocidad de traducción ya que incrementa la tasa de reciclado de eIF2, llegando a neutralizar en algunos



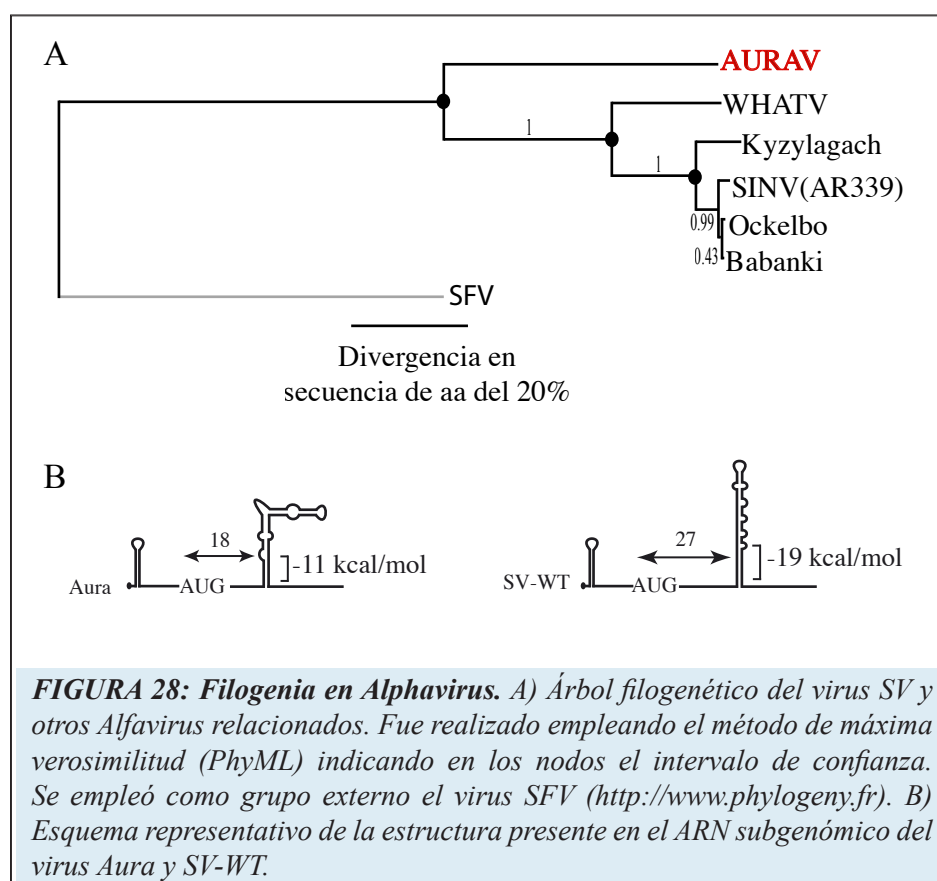
casos el efecto de la fosforilación del factor eIF2 (Balachandran et al. 2004). Trabajos previos muestran que existe un incremento de la subunidad catalítica ε del factor eIF2B (eIF2Bε) en ciertas líneas celulares de origen tumoral y en tumores humanos (Balachandran et al. 2004, Gallagher et al. 2008). Por ello, decidimos cuantificar los niveles de eIF2Bε en las líneas transformadas con Ras. Tal y como se observa en la figura 26 B, no encontramos diferencias significativas en los niveles de expresión de eIF2Bε entre la línea 3T3 y las líneas transformadas con Ras.

Por último decidimos estudiar la síntesis de proteínas en células H-Ras, K-Ras y N-Ras infectadas con los virus SV mediante marcaje metabólico con  $^{35}\text{S}$ -Met. Sorprendentemente observamos que la síntesis de proteínas en células H-Ras, K-Ras y N-Ras no se vió inhibida por la infección con el virus SV a diferencia de lo que ocurre en NIH-3T3 (**Fig. 26A**). Además, en este experimento se comprobó que todas las células habían sido infectadas con el virus, lo que descarta la existencia de una

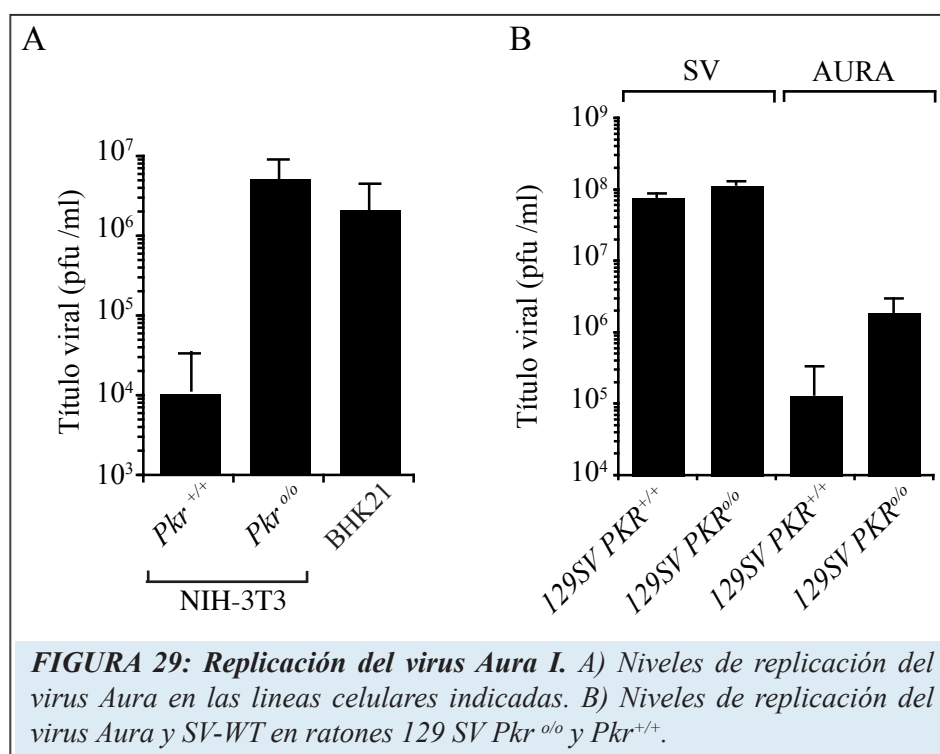
fracción no infectada de células que estuviera falseado el experimento (datos no mostrados).

### ***B.2 Propiedades oncolíticas del virus AURA, un alfavirus emparentado con Sindbis, con características similares al virus SV-ΔDLP***

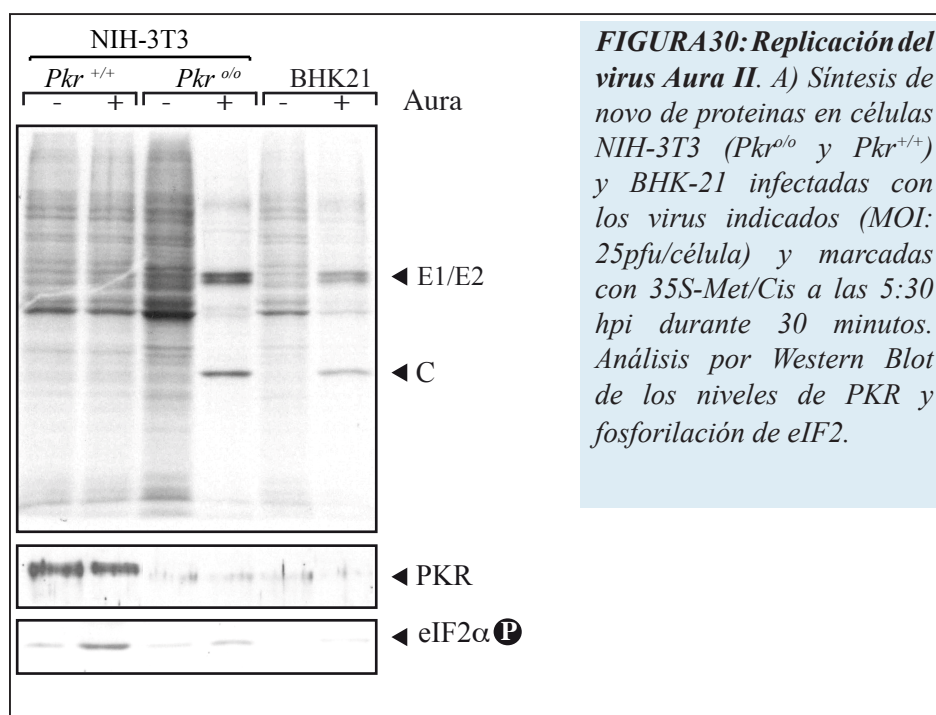
La estructura DLP se encuentra muy conservada en los diferentes subtipos y aislados de Sindbis y la mayoría de los virus que conforman el género Alfavirus, pero no en todos. Una excepción es el virus Aura, el único miembro del grupo de virus relacionados con Sindbis (*Sindbis-like*) que se encuentra exclusivamente en el Nuevo Mundo (**Fig. 28A**). Este virus sólo se ha detectado en mosquitos y su capacidad de infectar



vertebrados se desconoce en gran medida. Observamos que los programas de predicción de estructura secundaria de ARN predicen una estructura del tipo DLP pero de estabilidad inferior a la que presenta el virus SV. Además, la distancia desde el AUG iniciador hasta la base de la estructura DLP es de 18 nts en el virus Aura, lo que es sustancialmente más corta que la observada en el resto de los Alfavirus la cual varía entre 27-32 nts (**Fig. 28B**). Estas observaciones nos condujeron a pensar que tal vez, al igual que el virus Sindbis mutante SV- $\Delta$ DLP, los ARNm 26S del virus Aura no fuesen capaces de traducir en presencia del factor eIF2 fosforilado. Para comprobar esta posibilidad, analizamos la producción viral, la síntesis de proteínas y la fosforilación de eIF2 en células NIH-3T3  $Pkr^{+/+}$ ,  $Pkr^{o/o}$  y BHK-21 infectadas con el virus Aura. En células  $Pkr^{+/+}$  no observamos signos de replicación viral, mientras que en células  $Pkr^{o/o}$  y BHK-21 el virus sintetizó niveles considerables de proteína y replicó produciendo títulos





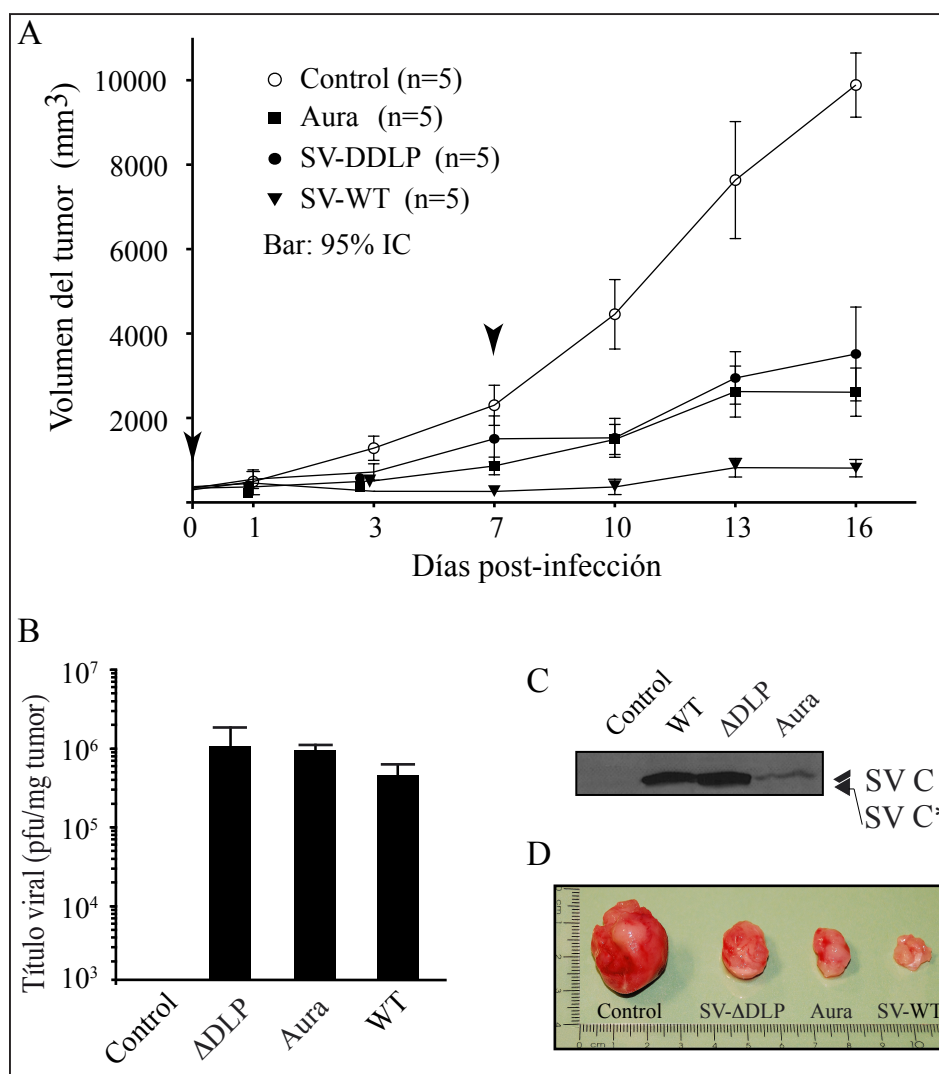


virales entre  $10^7$  y  $10^8$  pfu/ml (**Fig. 29A**). Este bloqueo de la replicación del virus Aura en células  $Pkr^{+/+}$  correlaciona con la fosforilación de eIF2, que no se observó ni en células  $Pkr^{o/o}$  ni en BHK-21. No obstante, los niveles de activación de PKR y de fosforilación de eIF2 en células NIH-3T3 infectadas con el virus Aura fueron substancialmente menores a los observados en células infectadas con SV, aunque suficientes para boquear la síntesis de las proteínas del virus en estas células (**Fig. 30**). En ratones, el virus Aura muestra también cierta sensibilidad a la presencia de PKR aunque de un modo menos acusado que en el caso del virus SV- $\Delta$ DLP (**Fig. 29B**). La posible estructura secundaria DLP de baja estabilidad, pronosticada por los programas de predicción del plegamiento del ARN sobre el ARNm 26S del virus Aura, no parece suficiente para conferir resistencia traduccional a la activación de PKR. Esto probablemente impide en buena medida al virus Aura replicar en células normales de vertebrados que presenten una actividad normal de PKR.

### ***B.3 Actividad oncolítica de los virus SV salvaje, SV-ΔDLP y Aura sobre tumores inducidos en ratones SCID***

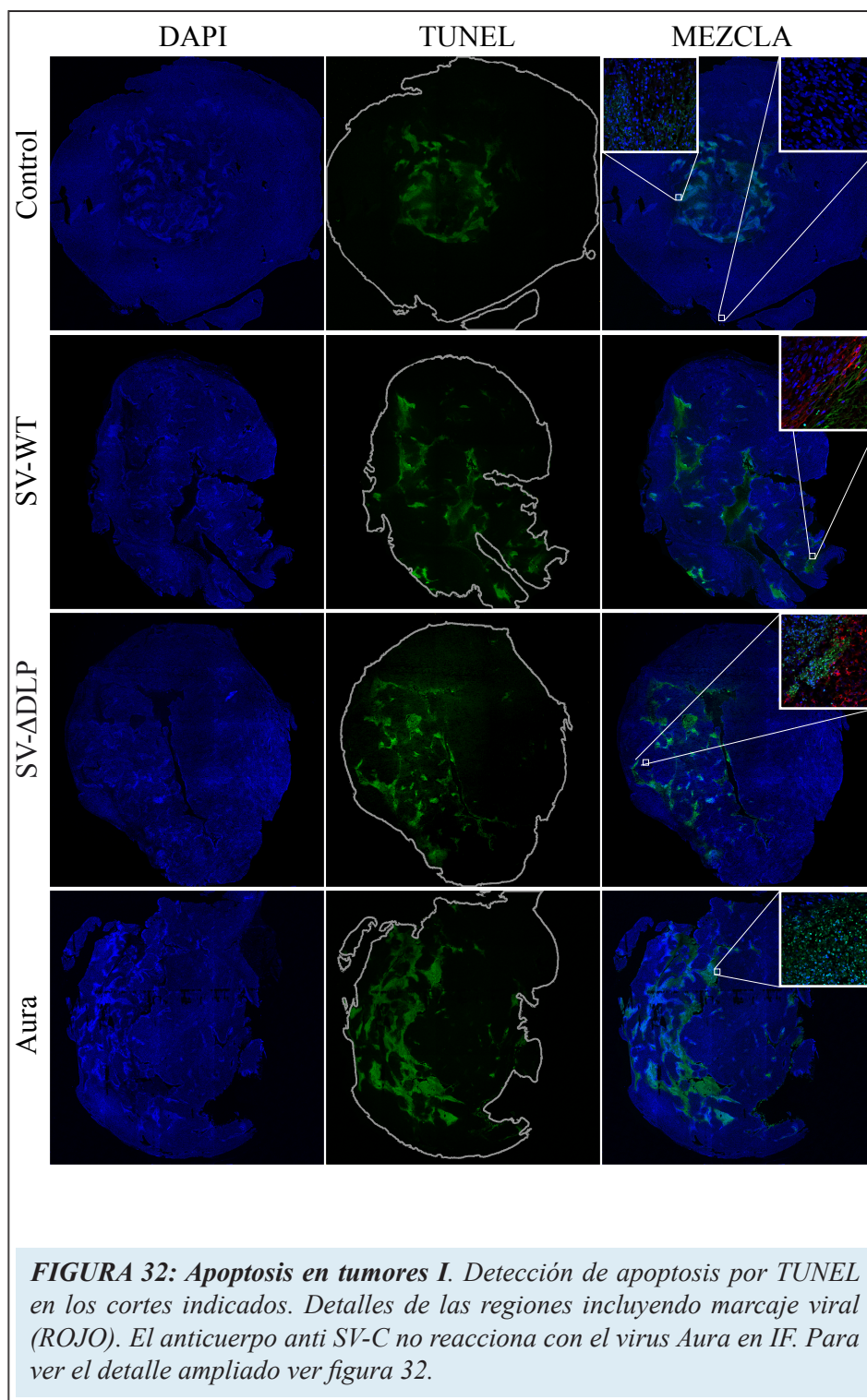
#### *B.3.1 Niveles de replicación de los virus en los tumores.*

La replicación diferencial de los virus SV-ΔDLP y Aura en ciertas líneas tumorales como BHK-21 nos animó a ensayar su actividad oncolítica sobre tumores inducidos en ratones SCID. Para ello indujimos tumores heterotípicos en ratones SCID mediante implantación subcutánea de  $10^6$  células BHK-21. Los tiempos de latencia hasta la aparición de los tumores detectables a la palpación fueron de aproximadamente 1 semana. Observamos la alta tumorigenicidad de estas células y su rápido crecimiento, de modo que en dos semanas el volumen del tumor multiplicó más de 20 veces su tamaño inicial (**Fig. 31A**). Inoculamos grupos de animales con 2-3 dosis de cada uno de los virus (SV-WT, SV-ΔDLP y Aura) espaciadas 1 semana, y que consistieron en la administración por vía intraperitoneal de  $10^7$  pfu por ratón (**Fig. 31B**). Los análisis realizados a partir de los datos del volumen del tumor muestran una clara inhibición del crecimiento tumoral, el cual fue más acusado en el caso del virus SV-WT y algo menor para el virus Aura. El grupo de ratones inoculados con el virus SV-ΔDLP mostraron un efecto intermedio entre los dos anteriores. A los 16 dpi procedimos a realizar un análisis detallado de la replicación viral en los ratones infectados. Extrajimos el cerebro, hígado, pulmón y el tumor de los ratones infectados así como del grupo control y comprobamos que existía replicación activa de los tres virus dentro del tumor en los ratones infectados, alcanzando títulos cercanos a  $10^6$  pfu. No detectamos replicación de ninguno de los virus en el resto de los órganos analizados.



**FIGURA 31:** A) Curva de crecimiento de los tumores s.c de BHK-21 tratados con los virus indicados. (n=5). El tratamiento afecta significativamente al crecimiento del tumor al compararlo con el control. ( $P < 0,0001$ ; two-way ANOVA). Las flechas indican las dosis aplicadas. B) niveles de replicación del virus indicados presentes en los tumores. C) Análisis por Western Blot de la presencia de cada uno de los virus mediante la detección de la proteína SV-C. A pesar de no estar empleando un anticuerpo específico para la proteína C de Aura, podemos detectar una banda de proteína C. D) Imagen representativa del tamaño de los tumores extraídos de los ratones a los 16 dpi.

\* Nótese el doblete característico que presenta virus mutante.



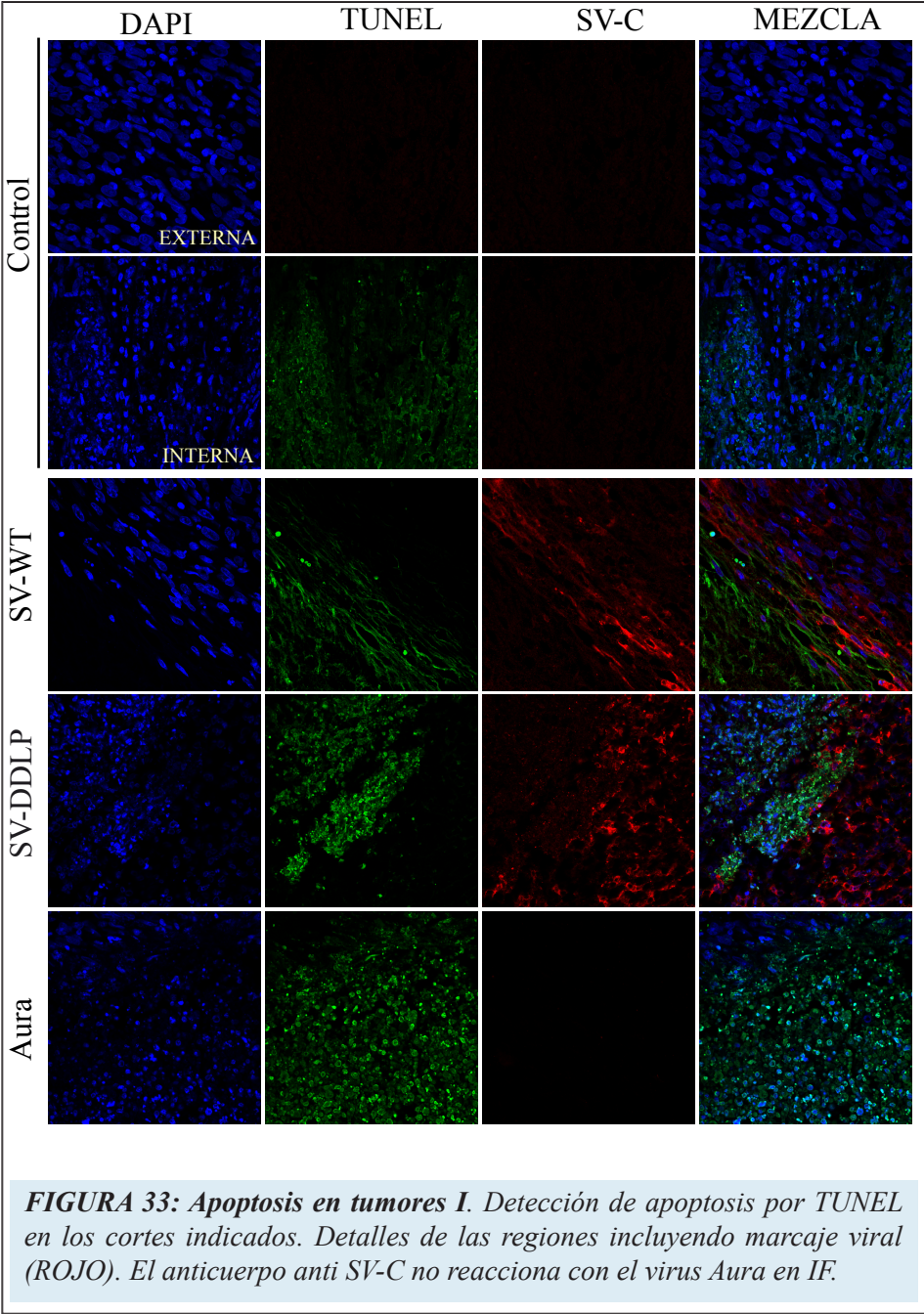
### *B.3.2 Inmunodetección de los virus en los tumores.*

Para confirmar la presencia de los virus en los tumores procedentes de ratones inoculados, procedimos a analizar los homogenados por western blot. Como se puede ver en la figura 31 C, podemos detectar claramente la proteína SV-C en los extracto de tumores infectados con el virus SV-WT y SV- $\Delta$ DLP observándose en este último el doblete característico que presenta este virus mutante debido a la posibilidad de iniciar la traducción en un segundo AUG. Observamos que el anticuerpo anti-C generado frente a Sindbis reaccionó contra la proteína C de Aura en western-blot. Este resultado nos confirma que los tumores han sido infectados con los virus que esperábamos en cada caso y que los resultados obtenidos son atribuibles al efecto de dichos virus.

### *B.3.3 Relación entre muerte celular y la presencia del virus.*

A continuación, tratamos de relacionar la presencia del virus con la muerte del tejido tumoral. Sobre cortes en parafina de los tumores de ratones infectados, detectamos las regiones de replicación viral del virus SV-WT y SV- $\Delta$ DLP por inmunofluorescencia empleando el anticuerpo contra la cápsida de SV. En las regiones infectadas pudimos observar un cambio en la morfología nuclear. Observamos una condensación de la cromatina en la periferia nuclear acompañada de fragmentación. Estos cambios morfológicos también se observan en los cortes de los tumores procedentes de ratones infectados con el virus Aura, si bien no pudimos detectar replicación viral con el anticuerpo contra la cápsida de SV ya que éste no reacciona con la cápsida de Aura en inmunofluorescencia (**Fig. 32 y 33**). Se sabe que el virus Sindbis es capaz de inducir apoptosis en las células que infecta (Irusta et al. 2004, Venticinque et al 2010). Por ello, una manera de atribuir de forma directa la muerte celular al virus podría





ser detectando regiones de apoptosis. Para ello sobre cortes en parafina de los tumores infectados hicimos un marcaje del extremo libre con dUTP (TUNEL, Terminal dUTP Nick End Labeling). Como se observa en la figura, pudimos detectar regiones positivas al marcaje por TUNEL en todos los cortes de tumores. Este marcaje además de ser más intenso en los tumores infectados, presentaba una localización tanto periférica como centralizada en el interior del tumor (**Fig. 32**). Los tumores que no habían sido infectados mostraban una señal de TUNEL menos intensa y muy restringida a las regiones internas del tumor, situación habitual que tiene lugar por la muerte por anoxia en los tumores. El marcaje de las regiones infectadas con el virus SV mostraba la presencia de zonas de infección activa muy próximas a los lugares de marcaje positivo con TUNEL (**Fig. 33**). Con estos resultados podemos afirmar que el efecto sobre el crecimiento tumoral es debido a la acción de los virus.





# DISCUSIÓN

## ***A. RESPUESTA ANTIVIRAL Y RESISTENCIA VIRAL***

Los virus necesitan sintetizar y acumular gran cantidad de proteínas, sobre todo de aquellas que van conformar los viriones y de cuya eficiencia depende en gran medida el éxito de la infección. El hecho de que el factor de iniciación de la traducción eIF2 sea un punto de convergencia en la respuesta celular al estrés, y uno de los mecanismos empleados por la célula para bloquear la replicación viral, lo convierten en un objetivo preferente de los virus a la hora de desarrollar mecanismos y sistemas que, en definitiva, permitan la replicación eficiente en las células de los animales infectados (Garcia et al. 2006, Katze et al. 2002). Como ya comentamos anteriormente, los virus han desarrollado mecanismos muy diversos en forma y función, y que casi siempre mimetizan molecularmente elementos del hospedador para evitar que la respuesta antiviral de la célula pueda comprometer la replicación viral (Elde et al. 2009). Entre ellos cabe destacar la originalidad de los Alfavirus, que lejos de emplear sistemas que impidan la inactivación del factor eIF2, han aprendido a convivir con ello sin que esto suponga ningún detrimento en su capacidad replicativa (Ventoso et al. 2006). Para ello, han adquirido un mecanismo traduccional tal que los ARNm virales son capaces de traducir en ausencia de eIF2. Este sistema está basado en la presencia de una estructura secundaria del ARNm 26S

del virus denominada DLP, situada por detrás del AUG iniciador y por lo tanto embebida en la secuencia codificante del ARNm (Frolov et al. 1994, Frolov et al. 1996, Ventoso et al. 2006) (**Fig. 33**). En la presente memoria hemos demostrado el papel clave de esta estructura en la replicación viral, en la interacción virus-hospedador y en sus aplicaciones prácticas en el desarrollo de marcadores traduccionales y virus oncolíticos. Además, creemos que el estudio de las estructuras reguladoras en los ARNm virales pueden ser claves para entender la traducción diferencial de ciertos ARNm de la célula en situaciones de estrés.

## ***B. LA ESTRUCTURA DLP Y LA REPLICACIÓN DE LOS ALFAVIRUS***

Al igual que ocurre en cultivos celulares, la eliminación de la estructura DLP generó un virus Sindbis mutante con una capacidad casi nula de replicar en ratones normales (Pkr<sup>+/+</sup>), lo que demuestra la importancia de esta estructura en la replicación del virus *in vivo*. Una atenuación similar en ratones ya había sido observada en otros virus como HSV-1, Vaccinia o Influenza cuando de sus genomas se eliminaron los genes  $\gamma$ 34.5, E3L y NS1 respectivamente, todos implicados en contrarrestar ( $\gamma$ 34.5) o bloquear (E3L y NS1) la activación de PKR en las células infectadas (Brandt et al. 2001, Chou et al. 1990, Langland et al. 2002, Mohr 2004). Estos paralelismos sugieren que, a pesar de su diferente naturaleza, las estructuras *in cis* de los ARNm 26S de los Alfavirus (DLP) desempeñan una función análoga a las proteínas anti-PKR que expresan otros virus con genoma ADN o ARN y que no están relacionados filogenéticamente con los Alfavirus (Domingo-Gil, Toribio R et al. 2010). Sin embargo, una diferencia importante entre los dos mecanismos de resistencia antiviral es que las proteínas virales anti-PKR tales como E3L y NS1 exhiben otras

funciones adicionales aparte de la mera inhibición de PKR, tales como el bloqueo de los receptores RIG-I o DAI que neutralizan de esta manera la respuesta innata de la célula (Bowie et al. 2008, Pichlmair et al. 2006, Wang et al. 2008). En Alfavirus, el mecanismo de resistencia basado en la estructura DLP de los ARNm virales confiere exclusivamente resistencia traduccional a la activación de PKR y fosforilación de eIF2 $\alpha$  en las células o animales infectados por el virus. Esto queda perfectamente ilustrado en la figura 14 C, en donde la replicación del virus mutante  $\Delta$ DLP se restableció hasta alcanzar los niveles del virus salvaje en ratones deficientes en el gen *pkr*. Estos resultados demuestran que, a diferencia del virus SV salvaje, la traducción de los ARNm del virus mutante  $\Delta$ DLP muestran una dependencia estricta del factor eIF2.

Una observación que nos llamó la atención fue el hecho de que la replicación del virus mutante  $\Delta$ DLP estuviera muy mermada, pero no abolida completamente en ratones normales ( $Pkr^{+/+}$ ). Estudios anatómicos revelaron que mientras el virus SV WT era capaz de propagarse rápidamente por la corteza cerebral del ratón formando focos de infección amplios, el virus mutante  $\Delta$ DLP sólo fue capaz de replicar en unas pocas neuronas aisladas de la región ventral-anterior del cerebro (corteza piriforme y regiones talámicas). En las inoculaciones intranasales, los virus penetran a través del neuroepitelio olfativo hasta alcanzar el bulbo olfatorio en donde replican durante los primeros dos días de infección. A partir del día 3, el virus salvaje asciende propagándose a través de la corteza cerebral desde la región piriforme hasta alcanzar las regiones frontales, motoras y somatosensoriales de la corteza cerebral. El virus mutante  $\Delta$ DLP, en cambio, fue incapaz de propagarse de este modo ascendente y su escasa replicación se restringió a las regiones más basales de la corteza (**Fig. 15**). Estamos bastante seguros de que la mayor parte de las células infectadas por el virus salvaje son neuronas piramidales de las capas II-IV de la corteza cerebral,

aunque en el caso del virus mutante  $\Delta$ DLP no hemos podido confirmar todavía el tipo de neuronas que infecta. Una posibilidad interesante es que el virus mutante sólo sea capaz de infectar aquellas neuronas que por alguna razón no son capaces de montar una respuesta antiviral frente al virus basada en la activación de PKR y la consiguiente fosforilación de eIF2. Una posible explicación es que los niveles de expresión de la quinasa PKR fueran más bajos en las neuronas que el virus mutante es capaz de infectar, aunque el análisis de la expresión del gen *pkr* en corteza cerebral del ratón muestra una expresión elevada y uniforme (<http://www.brain-map.org>). También cabe la posibilidad de que sean neuronas en un estadio de diferenciación bajo, de modo que su sistema de respuesta innata frente a los virus no haya madurado lo suficiente como para bloquear la replicación del virus mutante. Esta última posibilidad está siendo analizada en la actualidad ya que podría relacionarse con el oncotropismo que el virus mutante  $\Delta$ DLP exhibe sobre varias líneas tumorales de ratón y humanas (ver más adelante).

### ***C. MARCADORES TRADUCCIONALES Y SHUT-OFF IN VIVO***

Hasta la fecha, los Alfavirus han sido empleados como herramientas para expresar genes heterólogos gracias a los altos niveles de expresión que se obtienen (Lundstrom 2005, Nanda et al. 2009). Se emplean para estudios de electrofisiología en tejidos neuronales, expresión de genes suicidas en tumores, e incluso como vacunas (Ehrensgruber et al. 1999, Lundstrom 2005). En esta memoria hemos empleado virus SV recombinantes para abordar el estudio del *shut off* traduccional en animales, un fenómeno conocido *in vitro* desde los años 60 cuando se describió por primera vez la interferencia de un virus animal sobre la traducción de células en cultivo

(Holland et al. 1964). Sin embargo, este fenómeno no había sido estudiado hasta la fecha *in vivo*, en parte por las dificultades metodológicas para poder medir con precisión la síntesis de proteínas de las células de los tejidos en los animales infectados con virus. En este trabajo, desarrollamos una metodología experimental que permite estimar la síntesis de proteínas de la célula infectada y la del propio virus en los tejidos de los animales. Desde los trabajos pioneros de Rodriguez y Esteban, los virus recombinantes que expresan genes marcadores han sido ampliamente utilizados para estudiar la replicación de los virus en tejidos y tipos celulares de los animales infectados (Rodriguez et al. 1988). En nuestra aproximación experimental hemos generado marcadores heterólogos que mimetizan el comportamiento traduccional de los ARNm virales y celulares en las células infectadas con el virus Sindbis. Los resultados obtenidos demuestran que la traducción de los ARNm no virales se encuentra fuertemente inhibida en cultivos celulares y en neuronas de ratones infectados. Esta afirmación se basa en dos resultados fundamentales. Primero, observamos que tanto los ARNm de EGFP como los de luciferasa ven inhibida su traducción de la misma forma que la mayoría de los ARNm celulares (ej.  $\beta$ -actina) en las células infectadas (**Fig. 20**). Segundo, la colocación de la estructura viral DLP en el extremo 5' de la secuencia codificante de EGFP y de luciferasa permitió la recuperación traduccional de estos marcadores hasta alcanzar niveles comparables a los obtenidos para los ARNm 26S del virus que codifican las proteínas estructurales. Además, dado que los marcadores traduccionales se sintetizan a partir de un promotor viral, nuestro sistema obvia las perturbaciones que el virus SV pueda provocar sobre la transcripción y/o estabilidad de los ARNm celulares, pudiendo atribuir de este modo la medida de los marcadores exclusivamente a su eficiencia traduccional (Gorchakov et al. 2005, Inglis 1982, Katze et al. 1990). A pesar de que la mayoría de los virus alteran de alguna manera el metabolismo del ARN

celular (Kaariainen et al. 1984) en las células infectadas con el virus Sindbis no detectamos diferencias significativas en la cantidad y el estado de ARNs abundantes en la célula tales como  $\beta$ -actina o ARNr a las 6 hpi, momento en el que el bloqueo traduccional es completo (**Fig. 20A**). Este hecho sugiere que si bien la síntesis *de novo* de ARNm celulares puede estar inhibida a las 6hpi con el virus Sindbis, la estabilidad de estos ARNm no se acelera significativamente. Además, lo que es más importante, la colocación de la estructura DLP en los marcadores EGFP y Luciferasa no alteró significativamente la acumulación de los correspondientes ARNm en las células infectadas, lo que indica que esta estructura actúa exclusivamente a nivel traduccional. Tomados en su conjunto, creemos que nuestros resultados demuestran claramente que, al menos en el caso de los Alfavirus, la infección desencadena una fuerte inhibición de la traducción celular en animales infectados. Pensamos que esta estrategia puede ser empleada en otros sistemas virales para evaluar hasta qué punto el *shut off in vivo* es un fenómeno general a la mayoría de los virus. Para ello es necesario un conocimiento previo de los mecanismos moleculares que permiten a un virus dado traducir sus ARNm en una situación general de bloqueo traduccional. Algunos de estos mecanismos se encuentran bastante bien definidos en picornavirus, VSV, adenovirus y rotavirus pero no en otros como los Poxvirus (Bushell et al. 2002, Connor et al. 2002, Huang et al. 1991, Piron et al. 1998, Zhang et al. 1994). La baja dependencia que presentan VSV y Adenovirus por la proteína de unión a cap eIF4E puede permitir generar ARNm marcadores con capacidad traduccional diferencial en células infectadas con estos virus (Berg et al. 1992), simplemente construyendo ARNm marcadores con regiones 5' UTR muy cortas y sin estructura, y comparando su expresión con ARNm marcadores con regiones 5'UTR más largas y estructuradas. Una limitación de esta estrategia es que se requiere el uso de un segundo promotor viral para lograr que los ARNm

marcadores se fabriquen de modo independiente. Esto excluye a todos los virus que inician la transcripción desde el extremo y dan lugar a un ARNm monocistrónico como es el caso de los Picornavirus.

Por otra parte, la estrategia experimental descrita en esta memoria podría mejorar los niveles de expresión de genes heterólogos en los vectores virales basados en Sindbis que se emplean de manera habitual para la expresión de genes en tejidos neuronales (cultivos organotípicos de cerebro) dado su carácter neurotrópico (Ehrensgruber et al. 1999, Xiong et al. 1989), o en los sistemas vacunales que emplean vectores de Sindbis en forma de ADN para la inmunización frente al gene de interés (Lundstrom 2000). Creemos que nuestro trabajo podría aportar mejoras al diseño de estos vectores mediante la incorporación de la estructura DLP a los genes heterólogos, permitiendo la expresión de estos genes exógenos en todas y cada una de las células transducidas con estos vectores virales.

La descripción de la fosforilación del factor eIF2 $\alpha$  en las células de los animales infectados con Sindbis es un hecho notable ya que se trata de la primera demostración directa de que una infección viral desencadena la inactivación de un factor de traducción *in vivo* (**Fig. 23A**). La fosforilación de este factor ya había sido descrita en neuronas piramidales del hipocampo de ratas sometidas a isquemia cerebral, un tipo de estrés que al igual que la infección con ciertos virus desencadena la activación de las eIF2 $\alpha$  quinasas (Burda et al. 1994). Además, en ciertas patologías neurodegenerativas se han detectado tanto la activación permanente de PKR como la fosforilación de eIF2 en neuronas corticales (Onuki et al. 2004). Estos paralelismos con los resultados presentados en esta memoria refuerzan la idea de que la célula detecta las infecciones virales como el resto de las situaciones de estrés, promoviendo la fosforilación del factor eIF2, paralizando la síntesis general de proteínas y activando la expresión de genes implicados en la respuesta al estrés (Dever 2002).

Una implicación que no pasamos por alto es el hecho de que la paralización de la síntesis de proteínas celulares tras la fosforilación de eIF2 $\alpha$  en respuesta a la infección con Sindbis impediría a la célula sintetizar cualquier tipo de proteína con actividad antiviral (ej. IFNs y TNF $\alpha$ ). Esta predicción la confirman algunos resultados experimentales nuestros (no mostrados aquí) y de otros grupos, en los que se demuestra que las células infectadas con Sindbis son incapaces de secretar IFN $\alpha/\beta$  a pesar de que el factor de transcripción IRF-3 implicado en la síntesis del ARNm de IFN $\alpha/\beta$  se activa en las células infectadas con los Alfavirus (Burke et al. 2009, Frolova et al. 2002). Además, estos virus son en general muy sensibles al efecto de los IFNs, de modo que permitir la respuesta de la célula a través de la fosforilación de eIF2 pudo haber sido inicialmente beneficioso para estos virus, que sólo tuvieron que adquirir la estructura DLP para resistir traduccionalmente a la fosforilación de eIF2. Una observación similar ha sido documentada recientemente en las células infectadas con HCV, en donde la activación de PKR y la fosforilación de eIF2 $\alpha$  bloquean la traducción de los ARNm inducidos por interferón (ISGs) sin afectar a la traducción de los ARNm de HCV (Garaigorta et al. 2009).

#### ***D. TROPISMO VIRAL Y ONCOLÍISIS***

El estudio de las alteraciones traduccionales en las células y los tejidos infectados con el virus Sindbis nos condujo a profundizar en algunos aspectos del tropismo viral. En términos generales, el tropismo de los virus por un tejido o célula concreta está determinado por la existencia de los receptores celulares adecuados y los factores y maquinarias necesarias para que el virus pueda replicar sus genomas, traducir sus ARNm y formar la progenie viral. Si estas dos premisas se cumplen el virus podría replicar de manera eficiente, al menos teóricamente. En algunos casos como



poliovirus o HIV-1, la existencia de receptores y coreceptores específicos explica en buena medida el tropismo de especie y órgano que exhiben estos virus (Schneider-Schaulies 2000). Sin embargo, en otros virus como Sindbis que pueden usar varios receptores de expresión general (receptor de laminina, heparán sulfato o lectinas de superficie) deben de existir otros factores que dicten el tropismo del virus por el SNC (Klimstra et al. 2003, Smit et al. 2002, Wang et al. 1992). Además, en animales infectados existen otros determinantes tales como la producción de citoquinas antivirales y proinflamatorias del huésped (sobretudo IFNs y TNF $\alpha$ ) que pueden modular el tropismo restringiendo la replicación del virus a ciertos órganos (McFadden et al. 2009). Por ejemplo, el virus Sindbis exhibe un tropismo casi exclusivo por el SNC en ratones normales (Binder et al. 2001, Cook et al. 2003, Jackson et al. 1988, Lustig et al. 1988), y la eliminación del receptor de IFN $\alpha/\beta$  en los ratones amplía la replicación del virus Sindbis a otros órganos como el hígado, páncreas, músculo, bazo y pulmones que normalmente no son invadidos por el virus (Ryman et al. 2000). En cuanto al tropismo celular del virus Sindbis, nuestros datos indican que las células piramidales que el virus infecta responden de manera robusta a la infección a través de la fosforilación del eIF2 (**Fig. 23**). El hecho de que el virus mutante  $\Delta$ DLP sea incapaz de replicar eficientemente en estas células sugiere que los Alfavirus probablemente adquirieron la estructura DLP durante su adaptación a la replicación en el SNC de mamíferos, lo que les confirió la capacidad de infectar tipos celulares altamente diferenciados como las neuronas piramidales de animales adultos. Un aspecto interesante que relaciona control de la traducción y diferenciación celular es el hecho de que las células poco diferenciadas (células embrionarias y transformadas) presentan ritmos de traducción acelerados y ciertas alteraciones en el control de la síntesis de proteínas (Holland et al. 2004, Silvera et al. 2010, Watkins et al. 2002). Además, las

células tumorales suelen tener suprimida la respuesta antiviral innata que las hace insensibles al efecto de los IFNs, constituyendo un lugar ideal para la replicación viral (Parato et al. 2005, Stojdl et al. 2000). El hecho de que el virus mutante  $\Delta$ DLP sea capaz de replicar eficientemente en ciertas líneas tumorales de ratón y humanas, sugiere la posibilidad de que las pocas neuronas infectadas por el virus mutante  $\Delta$ DLP representen tipos celulares poco diferenciados incapaces todavía de activar una respuesta robusta frente al virus. Aunque la neurogénesis en mamíferos adultos esta muy limitada a ciertas regiones subventriculares y del hipocampo (Gould 2007), es posible que el virus  $\Delta$ DLP pueda infectar ciertas neuronas poco diferenciadas durante su proceso de migración hacia el bulbo olfatorio, región donde ocurre una cierta reposición celular en adultos. Datos recientes de nuestro laboratorio no incluidos en esta memoria indican que las pocas neuronas que el virus  $\Delta$ DLP es capaz de infectar no mostraron fosforilación de eIF2 ni en animales infectados ni en explantes de rata. Además, estas células no se tiñeron con anticuerpos anti-NeuN, un típico marcador de neuronas piramidales maduras. Estos resultados refuerzan bastante nuestro modelo, aunque para confirmarlo definitivamente serán necesarios más experimentos.

¿Hasta qué punto el virus mutante  $\Delta$ DLP se puede catalogar como oncotrópico?. Hasta el momento hemos analizado la replicación de este virus mutante en 11 líneas transformadas de ratón y humanas que exhiben diferente grado de tumorigenicidad y hemos encontrado un oncotropismo marcado por ciertas líneas transformadas con los oncogenes *Ras*, por algunos astrocitomas humanos (U87) y por ciertas líneas embrionarias de roedor como BHK-21. Sin embargo, en otras líneas tumorales como HeLa y Hep-G2 no detectamos replicación eficiente del virus mutante  $\Delta$ DLP respecto al virus WT. Este oncotropismo específico por algunas líneas tumorales no es sorprendente dada la gran diversidad genética

que presentan las células tumorales entre sí, sumada a la extensiva manipulación en cultivo a la que algunas líneas han sido sometidas. Estas diferencias se aprecian en los niveles de expresión del gen *pkr*, casi indetectable en algunas líneas (BHK-21, Hep-G2) y más alto en otras como en las células transformadas con los oncogenes *Ras*. En BHK-21, el ligero incremento en la fosforilación de eIF2 en respuesta a la infección con Sindbis explica el por qué el virus mutante  $\Delta$ DLP puede replicar eficientemente en estas células. Es probable que la baja expresión de PKR en las células BHK-21 permita mantener niveles activos de eIF2 tras la infección, permitiendo de esta manera la traducción eficiente del virus mutante  $\Delta$ DLP. Una observación interesante que merece ser destacada es que los niveles basales de fosforilación del factor eIF2 en ciertas líneas como BHK-21 o A9 fueron substancialmente más altos que en líneas no transformadas (MEFs y NIH3T3) tal y como se ha descrito recientemente (Ventoso et al.2010) (**Fig. 26B**). A pesar de ello, estas células son capaces de sintetizar proteínas a ritmos muy altos, lo que indica que la regulación de la actividad de eIF2 está alterada en estas células (Balachandran et al. 2004, Ventoso et al 2010.). En las células transformadas con los oncogenes *Ras* la situación es diferente ya que la presencia de niveles substanciales de la quinasa PKR permitió a estas células fosforilar el factor eIF2 a niveles considerables en respuesta a la infección con Sindbis, si bien es cierto que las células H-Ras lo hicieron a un nivel inferior a las células NIH-3T3 no transformadas. En las tres líneas transformadas, sin embargo, el virus mutante sintetizó cantidades suficientes de proteínas estructurales como para replicar a niveles comparables al virus salvaje, lejos de las diferencias observadas en las células no transformadas (NIH-3T3 y MEFs). Es posible que la menor fosforilación de eIF2 en las células H-Ras en respuesta a la infección permita disponer de una cierta cantidad de factor activo que promueva una traducción de los ARNm 26S del virus mutante  $\Delta$ DLP lo

suficientemente alta como para que el virus replique a niveles similares al virus salvaje en estas células. Sin embargo, esta posibilidad no puede explicar nuestros resultados con las células transformadas con K-Ras y N-Ras, ya que el virus mutante replicó en estas líneas a niveles parecidos al virus salvaje aún cuando estas células fosforilaron el eIF2 en respuesta a la infección a un nivel parecido a las NIH-3T3. El comportamiento de las líneas transformadas con los oncogenes *Ras* en cuanto a su permisividad al virus mutante  $\Delta$ DLP puede ser reproducido empleando los virus Sindbis recombinantes con los marcadores traduccionales Luc y DLP-Luc, lo que sugiere que esta permisividad ocurre básicamente por una desregulación traduccional en las líneas transformadas.

La inconsistencia observada entre los niveles de fosforilación de eIF2 y la replicación del virus mutante  $\Delta$ DLP en las líneas transformadas con los oncogenes *Ras* nos llevó a analizar la actividad de recambio del factor eIF2 en estas células, que es promovida esencialmente por el factor eIF2B. Trabajos previos describieron que ciertas líneas transformadas eran capaces de traducir eficientemente en presencia de unos niveles anormalmente altos de eIF2 fosforilado (Balachandran et al. 2004). Esta aparente paradoja se explica por la presencia anormalmente alta de la subunidad catalítica ( $\epsilon$ ) de eIF2B en estas células, que aumenta la velocidad de recambio del factor eIF2 y contraresta el efecto de su fosforilación. Cuando analizamos los niveles de eIF2B $\epsilon$  no detectamos diferencias significativas entre las células NIH-3T3 y transformadas con los oncogenes *Ras*, por lo que pensamos que la desregulación en las células transformadas con los oncogenes *Ras* ocurre en otro punto que por el momento desconocemos. Trabajos previos indicaban que la permisividad que las células transformadas con Ras exhiben a virus con oncotropismo natural (Reovirus) o inducido (Adenovirus dl331, HSV-1, Influenza delNS1) se debía a la incapacidad de estas células a activar PKR y fosforilar eIF2 en respuesta a la infección, lo que dependía de la

activación constitutiva de las quinasas MEKs en estas células (Bergmann et al. 2001, Cascallo et al. 2003, Farassati et al. 2001, Strong et al. 1998). Sin embargo, datos recientes cuestionan algunas de las observaciones iniciales y sugieren que la permisividad de las células transformadas con Ras está relacionada con otras rutas de estrés como la de Ral/p38 (Norman et al. 2004, Schumann et al. 2006). En cualquier caso, lo que sí parece claro es que, a diferencia de lo que ocurre en células diferenciadas, la fosforilación del eIF2 en respuesta a la infección en células transformadas con Ras no provoca el mismo efecto sobre la traducción. Esto se ilustra en el sorprendente resultado mostrado en la figura 26, donde la infección y consiguiente fosforilación de eIF2 en las células transformadas con H-Ras y K-Ras no resultaron en una inhibición completa de la traducción celular (*shut off*).

Las similitudes encontradas entre el virus mutante  $\Delta$ DLP y el virus Aura en cuanto a requerimientos traduccionales y oncotropismo resultaron muy interesantes desde el punto de vista filogenético, ya que permiten imaginar un posible escenario evolutivo para la adquisición de la estructura DLP durante la historia natural de estos virus. El primordio de estructura DLP del virus Aura, menos estable que la de Sindbis y situada a una distancia del AUG diferente, hace que la traducción y replicación de este virus sea muy sensible a la presencia de PKR y a la fosforilación de eIF2. Al igual que el virus mutante  $\Delta$ DLP, el virus Aura fue incapaz de replicar en células o en ratones normales ( $Pkr^{+/+}$ ) aunque replicó eficientemente en células BHK-21 (**Fig. 29 y 30**). Creemos que el Aura virus podría tener propiedades oncotrópicas naturales como otros virus que ha sido aislados directamente del medio natural (New Castle virus (NCV) y Reovirus).

### ***E. ACTIVIDAD ONCOLÍTICA DEL VIRUS SV-ADLP***

El virus Sindbis en forma de vector no replicativo había sido empleado con éxito en experimentos de regresión tumoral en ratones SCID con tumores heterotípicos (Tseng et al. 2002). En esta memoria nosotros hemos ensayado con éxito la capacidad oncolítica del virus Sindbis  $\Delta$ DLP y el virus Aura sobre tumores de células BHK-21 inducidos en ratones SCID. La tumorigenicidad de las células BHK-21 y su rápido crecimiento tras su implantación subcutánea en los ratones constituye un desafío para cualquier virus oncolítico. Además, el nivel de exigencia del ensayo se incrementó a propósito permitiendo que los tumores alcanzaran un volumen mayor del que habitualmente se emplea en este tipo de ensayos en el momento de empezar a inocular el virus. De modo que el hecho de que los virus  $\Delta$ DLP y Aura hayan exhibido propiedades oncolíticas con tan sólo dos inoculaciones intraperitoneales constituye un éxito destacable, si bien es cierto que sus capacidades oncolíticas fueron algo inferiores a las mostradas por el virus Sindbis salvaje. En nuestros ensayos observamos una ligera disminución en la eficacia del tratamiento con el paso del tiempo. Este fenómeno podría ser debido a la aparición de tejido conjuntivo que encapsula el tumor a tiempos tardíos y que podría limitar la accesibilidad del virus. Existen trabajos que muestran la reducción en la permisividad de ciertos tumores a la infección por adenovirus debido al incremento de componentes de matriz y membrana basal (Bilbao et al. 2000). Nuestros datos demuestran que los tres virus replicaron eficientemente en los tumores e indujeron muerte celular en regiones periféricas del tumor asociada a la replicación viral, lo que indica que la parada del crecimiento tumoral se debe al efecto directo de la replicación viral dentro del tumor probablemente relacionada con apoptosis (Irusta et al. 2004, Jan et al. 1999). No obstante, los resultados del marcaje de TUNEL revelaron cierta muerte

celular en las regiones internas de los tumores no tratados con virus. Esto podría explicarse por el necrosamiento natural que estas regiones poco irrigadas sufren debido a fenómenos de hipoxia extrema (Vaha-Koskela et al. 2006). Por otra parte, no todas las regiones en las que detectamos antígenos virales correlacionaban con un marcaje positivo para TUNEL. La existencia de diferentes estadios apoptóticos o la posibilidad de que el virus sea capaz de inducir la muerte celular por lisis directa (necrosis) podría explicar estas diferencias. Los resultados presentados en esta memoria confirman la actividad oncolítica del virus Sindbis descrita por otros grupos (Tseng et al. 2002), aunque en nuestro caso al tratarse de virus con capacidad replicativa sólo fueron necesarias dos inoculaciones intraperitoneales para conseguir un efecto anti-tumoral. Esto constituye una ventaja respecto a los vectores de Sindbis no replicativos, que requieren inoculaciones sucesivas (diarias) para mantener los niveles de infección en el tumor a lo largo del tiempo.

¿Podrían ser estos virus empleados en viroterapia?. Atendiendo a las características ideales propuestas por Parato y Bell en su excelente revisión de 2005 (Parato et al. 2005) para que un virus pueda considerarse un buen candidato oncolítico, el virus mutante  $\Delta$ DLP debería ser considerado como un buen candidato. Como Alfavirus presenta una serie de características muy adecuadas para viroterapia: no es patógeno humano, puede ser suministrado sistémicamente, presenta un ciclo de infección lítico, admite cierta manipulación genética y al ser un virus ARN de replicación citoplásmica no es capaz de recombinar con el genoma celular. Además, al culminar su ciclo de replicación en vertebrados, estos virus son clarificados rápidamente por el sistema inmune. A estas características generales se le añaden las particulares que exhibe el mutante  $\Delta$ DLP: no es capaz de replicar ni en células diferenciadas ni en animales, y por lo tanto se trata de un virus muy atenuado y probablemente más seguro que el virus Sindbis

---

salvaje. Por último, el virus mutante  $\Delta$ DLP exhibe propiedades líticas similares al virus salvaje sobre varias líneas tumorales.







# CONCLUSIONES

1. Tanto *in vitro* como *in vivo*, la estructura DLP situada por detrás del AUG iniciador en los ARNm 26S de Sindbis es fundamental para conferir resistencia traduccional a la activación de la quinasa antiviral PKR.
2. La eliminación de la estructura DLP impide al virus replicar eficientemente en las neuronas piramidales de la corteza cerebral, aunque el virus mutante carente de DLP todavía es capaz de infectar algunas neuronas de la corteza piriforme y otras regiones ventrales del cerebro de ratón.
3. Es posible generar virus Sindbis recombinantes que expresen marcadores (EGFP y luciferasa) que mimeticen traduccionalmente a los ARNm virales y celulares.
4. Mediante el empleo de estos virus recombinantes hemos demostrado que el virus Sindbis induce un fuerte *shut off* de la traducción celular en animales y en explantes de tejidos infectados. Proponemos que esta estrategia experimental puede ser aplicada al estudio del fenómeno del *shut off* en otros virus.
5. La replicación del virus Sindbis en el cerebro del ratón desemboca en la activación de PKR y la fosforilación de eIF2.

6. El virus mutante carente de la estructura DLP replica a niveles muy bajos en células primarias de ratón, pero es capaz de replicar y destruir diversas líneas transformadas de ratón y humanas.

7. El virus Aura, un miembro de la familia de los Alfavirus muy emparentado con Sindbis, presenta características naturales similares al virus Sindbis mutante  $\Delta$ DLP. No es capaz de resistir la activación de PKR y por lo tanto su replicación en células primarias de ratón es muy baja, aunque en ciertas líneas tumorales replica eficientemente.

8. El virus Sindbis mutante  $\Delta$ DLP y el virus Aura, al igual que el virus Sindbis salvaje, fueron capaces de bloquear el crecimiento de tumores inducidos en ratones SCID mediante la implantación de células BHK-21.





# BIBLIOGRAFÍA

## A

Abraham N, Stojdl DF, Duncan PI, Methot N, Ishii T, Dube M, Vanderhyden BC, Atkins HL, Gray DA, McBurney MW, Koromilas AE, Brown EG, Sonenberg N & Bell JC. 1999. Characterization of transgenic mice with targeted disruption of the catalytic domain of the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR. *J Biol Chem* 274:5953-5962.

Acker MG, Shin BS, Nanda JS, Saini AK, Dever TE & Lorsch JR. 2009. Kinetic analysis of late steps of eukaryotic translation initiation. *J Mol Biol* 385:491-506.

Akiri G, Nahari D, Finkelstein Y, Le SY, Elroy-Stein O & Levi BZ. 1998. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression is mediated by internal initiation of translation and alternative initiation of transcription. *Oncogene* 17:227-236.

Aliperti G & Schlesinger MJ. 1978. Evidence for an autoprotease activity of sindbis virus capsid protein. *Virology* 90:366-369.

Anand N, Murthy S, Amann G, Wernick M, Porter LA, Cukier IH, Collins C, Gray JW, Diebold J, Demetrick DJ & Lee JM. 2002. Protein elongation factor EEF1A2 is a putative oncogene in ovarian cancer. *Nat Genet* 31:301-305.

August JT, Ortiz PJ & Hurwitz J. 1962. Ribonucleic acid-dependent ribonucleotide incorporation. I. Purification and properties of the enzyme. *J Biol Chem* 237:3786-3793.

## B

Balachandran S & Barber GN. 2004. Defective translational control facilitates vesicular stomatitis virus oncolysis. *Cancer Cell* 5:51-65.

Balachandran S, Roberts PC, Brown LE, Truong H, Pattnaik AK, Archer DR & Barber GN. 2000. Essential role for the dsRNA-dependent protein kinase PKR in innate immunity to viral infection. *Immunity* 13:129-141.

Barry G, Breakwell L, Fragkoudis R, Attarzadeh-Yazdi G, Rodriguez-Andres J, Kohl A & Fazakerley JK. 2009. PKR acts early in infection to suppress Semliki Forest virus production and strongly enhances the type I interferon response. *J Gen Virol* 90:1382-1391.

Berg DT & Grinnell BW. 1992. 5' sequence of vesicular stomatitis virus N-gene confers selective translation of mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 189:1585-1590.

Bergmann M, Garcia-Sastre A, Carnero E, Pehamberger H, Wolff K, Palese P & Muster T. 2000. Influenza virus NS1 protein counteracts PKR-mediated inhibition of replication. *J Virol* 74:6203-6206.

Bergmann M, Romirer I, Sachet M, Fleischhacker R, Garcia-Sastre A, Palese P, Wolff K, Pehamberger H, Jakesz R & Muster T. 2001. A genetically engineered influenza A virus with ras-dependent oncolytic properties. *Cancer Res* 61:8188-8193.



Berlanga JJ, Santoyo J & De Haro C. 1999. Characterization of a mammalian homolog of the GCN2 eukaryotic initiation factor 2alpha kinase. *Eur J Biochem* 265:754-762.

Berlanga JJ, Ventoso I, Harding HP, Deng J, Ron D, Sonenberg N, Carrasco L & de Haro C. 2006. Antiviral effect of the mammalian translation initiation factor 2alpha kinase GCN2 against RNA viruses. *Embo J* 25:1730-1740.

Bernstein P & Ross J. 1989. Poly(A), poly(A) binding protein and the regulation of mRNA stability. *Trends Biochem Sci* 14:373-377.

Bilbao R, Bustos M, Alzuguren P, Pajares MJ, Drozdzik M, Qian C & Prieto J. 2000. A blood-tumor barrier limits gene transfer to experimental liver cancer: the effect of vasoactive compounds. *Gene Ther* 7:1824-1832.

Binder GK & Griffin DE. 2001. Interferon-gamma-mediated site-specific clearance of alphavirus from CNS neurons. *Science* 293:303-306.

Black TL, Barber GN & Katze MG. 1993. Degradation of the interferon-induced 68,000-M(r) protein kinase by poliovirus requires RNA. *J Virol* 67:791-800.

Bowie AG & Unterholzner L. 2008. Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 8:911-922.

Brandt TA & Jacobs BL. 2001. Both carboxy- and amino-terminal domains of the vaccinia virus interferon resistance gene, E3L, are required for pathogenesis in a mouse model. *J Virol* 75:850-856.

Breindl M & Holland JJ. 1975. Coupled in vitro transcription and translation of vesicular stomatitis virus messenger RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:2545-2549.

Burda J, Martin ME, Garcia A, Alcazar A, Fando JL & Salinas M. 1994. Phosphorylation of the alpha subunit of initiation factor 2 correlates with the inhibition of translation following transient cerebral ischaemia in the rat. *Biochem J* 302 ( Pt 2):335-338.

Burke CW, Gardner CL, Steffan JJ, Ryman KD & Klimstra WB. 2009. Characteristics of alpha/beta interferon induction after infection of murine fibroblasts with wild-type and mutant alphaviruses. *Virology* 395:121-132.

Bushell M & Sarnow P. 2002. Hijacking the translation apparatus by RNA viruses. *J Cell Biol* 158:395-399.

## C

Cannarozzi G, Schraudolph NN, Faty M, von Rohr P, Friberg MT, Roth AC, Gonnet P, Gonnet G & Barral Y. 2010. A role for codon order in translation dynamics. *Cell* 141:355-367.

Cascallo M, Capella G, Mazo A & Alemany R. 2003. Ras-dependent oncolysis with an adenovirus VAI mutant. *Cancer Res* 63:5544-5550.

Castello A, Quintas A, Sanchez EG, Sabina P, Nogal M, Carrasco L & Revilla Y. 2009. Regulation of host translational machinery by African swine fever virus. *PLoS Pathog* 5:e1000562.

Chen SJ. 2008. RNA folding: conformational statistics, folding kinetics, and ion electrostatics. *Annu Rev Biophys* 37:197-214.

Chou J, Kern ER, Whitley RJ & Roizman B. 1990. Mapping of herpes simplex virus-1 neurovirulence to gamma 134.5, a gene nonessential for growth in culture. *Science* 250:1262-1266.

Christensen AK, Kahn LE & Bourne CM. 1987. Circular polysomes predominate on the rough endoplasmic reticulum of somatotropes and mammotropes in the rat anterior pituitary. *Am J Anat* 178:1-10.

Clark BF. 2006. The crystal structure of tRNA. *J Biosci* 31:453-457.

Clemens MJ & Elia A. 1997. The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. *J Interferon Cytokine Res* 17:503-524.

Colgan DF & Manley JL. 1997. Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes Dev* 11:2755-2766.

Connor JH & Lyles DS. 2002. Vesicular stomatitis virus infection alters the eIF4F translation initiation complex and causes dephosphorylation of the eIF4E binding protein 4E-BP1. *J Virol* 76:10177-10187.

Cook SH & Griffin DE. 2003. Luciferase imaging of a neurotropic viral infection in intact animals. *J Virol* 77:5333-5338.

Cooper JA & Moss B. 1978. Transcription of vaccinia virus mRNA coupled to translation in vitro. *Virology* 88:149-165.

Correia SS, Bassani S, Brown TC, Lise MF, Backos DS, El-Husseini A, Passafaro M & Esteban JA. 2008. Motor protein-dependent transport of AMPA receptors into spines during long-term potentiation. *Nat Neurosci* 11:457-466.

Crosby JS, Lee K, London IM & Chen JJ. 1994. Erythroid expression of the heme-regulated eIF-2 alpha kinase. *Mol Cell Biol* 14:3906-3914.

Cuesta R, Xi Q & Schneider RJ. 2000. Adenovirus-specific translation by displacement of kinase Mnk1 from cap-initiation complex eIF4F. *Embo J* 19:3465-3474.

## D

Dar AC, Dever TE & Sicheri F. 2005. Higher-order substrate recognition of eIF2alpha by the RNA-dependent protein kinase PKR. *Cell* 122:887-900.

Deng J, Harding HP, Raught B, Gingras AC, Berlanga JJ, Scheuner D, Kaufman RJ, Ron D & Sonenberg N. 2002. Activation of GCN2 in UV-irradiated cells inhibits translation. *Curr Biol* 12:1279-1286.

Dever TE. 2002. Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell* 108:545-556.

Dey M, Cao C, Dar AC, Tamura T, Ozato K, Sicheri F & Dever TE. 2005. Mechanistic link between PKR dimerization, autophosphorylation, and eIF2alpha substrate recognition. *Cell* 122:901-913.

## E

Ehrengruber MU, Lundstrom K, Schweitzer C, Heuss C, Schlesinger S & Gahwiler BH. 1999. Recombinant Semliki Forest virus and Sindbis virus efficiently infect neurons in hippocampal slice cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7041-7046.

Elankumaran S, Chavan V, Qiao D, Shobana R, Moorkanat G, Biswas M & Samal SK. Type I interferon-sensitive recombinant newcastle disease virus for oncolytic virotherapy. *J Virol* 84:3835-3844.

Elde NC & Malik HS. 2009. The evolutionary conundrum of pathogen mimicry. *Nat Rev Microbiol* 7:787-797.

## F

Farassati F, Yang AD & Lee PW. 2001. Oncogenes in Ras signalling pathway dictate host-cell permissiveness to herpes simplex virus 1. *Nat Cell Biol* 3:745-750.

Fayet MT. 1970. [Concentration of foot-and-mouth disease virus by polyethylene glycol]. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 118:356-366.

Feigenblum D & Schneider RJ. 1993. Modification of eukaryotic initiation factor 4F during infection by influenza virus. *J Virol* 67:3027-3035.

Fels DR & Koumenis C. 2006. The PERK/eIF2alpha/ATF4 module of the UPR in hypoxia resistance and tumor growth. *Cancer Biol Ther* 5:723-728.

Filipowicz W. 1978. Functions of the 5'-terminal m7G cap in eukaryotic mRNA. *FEBS Lett* 96:1-11.

Frolov I & Schlesinger S. 1996. Translation of Sindbis virus mRNA: analysis of sequences downstream of the initiating AUG codon that enhance translation. *J Virol* 70:1182-1190.

Frolov I & Schlesinger S. 1994. Translation of Sindbis virus mRNA: effects of sequences downstream of the initiating codon. *J Virol* 68:8111-8117.

Frolova EI, Fayzulin RZ, Cook SH, Griffin DE, Rice CM & Frolov I. 2002. Roles of nonstructural protein nsP2 and Alpha/Beta interferons in determining the outcome of Sindbis virus infection. *J Virol* 76:11254-11264.

Furuichi Y, LaFiandra A & Shatkin AJ. 1977. 5'-Terminal structure and mRNA stability. *Nature* 266:235-239.

## G

Gallagher JW, Kubica N, Kimball SR & Jefferson LS. 2008. Reduced eukaryotic initiation factor 2Bepsilon-subunit expression suppresses the transformed phenotype of cells overexpressing the protein. *Cancer Res* 68:8752-8760.

Gallie DR. 1991. The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes Dev* 5:2108-2116.

Garaigorta U & Chisari FV. 2009. Hepatitis C virus blocks interferon effector function by inducing protein kinase R phosphorylation. *Cell Host Microbe* 6:513-522.

Garcia MA, Gil J, Ventoso I, Guerra S, Domingo E, Rivas C & Esteban M. 2006. Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol Mol Biol Rev* 70:1032-1060.

Gerotto M, Dal Pero F, Pontisso P, Noventa F, Gatta A & Alberti A. 2000. Two PKR inhibitor HCV proteins correlate with early but not sustained response to interferon. *Gastroenterology* 119:1649-1655.

Ghadge GD, Malhotra P, Furtado MR, Dhar R & Thimmapaya B. 1994. In vitro analysis of virus-associated RNA I (VAI RNA): inhibition of the double-stranded RNA-activated protein kinase PKR by VAI RNA mutants correlates with the *in vivo* phenotype and the structural integrity of the central domain. J Virol 68:4137-4151.

Giedroc DP & Cornish PV. 2009. Frameshifting RNA pseudoknots: structure and mechanism. Virus Res 139:193-208.

Gingras AC, Raught B & Sonenberg N. 1999. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. Annu Rev Biochem 68:913-963.

Gingras AC, Svitkin Y, Belsham GJ, Pause A & Sonenberg N. 1996. Activation of the translational suppressor 4E-BP1 following infection with encephalomyocarditis virus and poliovirus. Proc Natl Acad Sci U S A 93:5578-5583.

Gorchakov R, Frolova E & Frolov I. 2005. Inhibition of transcription and translation in Sindbis virus-infected cells. J Virol 79:9397-9409.

Gould E. 2007. How widespread is adult neurogenesis in mammals? Nat Rev Neurosci 8:481-488.

Groppo R & Richter JD. 2009. Translational control from head to tail. Curr Opin Cell Biol 21:444-451.

## H

Ha I, Wightman B & Ruvkun G. 1996. A bulged lin-4/lin-14 RNA duplex is sufficient for *Caenorhabditis elegans* lin-14 temporal gradient formation. Genes Dev 10:3041-3050.

Hahn CS, Hahn YS, Braciale TJ & Rice CM. 1992. Infectious Sindbis virus transient expression vectors for studying antigen processing and presentation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:2679-2683.

Hall TM. 2002. Poly(A) tail synthesis and regulation: recent structural insights. *Curr Opin Struct Biol* 12:82-88.

Haller O, Kochs G & Weber F. 2007. Interferon, Mx, and viral countermeasures. *Cytokine Growth Factor Rev* 18:425-433.

Hamilton TL, Stoneley M, Spriggs KA & Bushell M. 2006. TOPs and their regulation. *Biochem Soc Trans* 34:12-16.

Harding HP, Zhang Y & Ron D. 1999. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397:271-274.

He B, Gross M & Roizman B. 1998. The gamma134.5 protein of herpes simplex virus 1 has the structural and functional attributes of a protein phosphatase 1 regulatory subunit and is present in a high molecular weight complex with the enzyme in infected cells. *J Biol Chem* 273:20737-20743.

Hershey JW. 1991. Translational control in mammalian cells. *Annu Rev Biochem* 60:717-755.

Hii SI, Hardy L, Crough T, Payne EJ, Grimmett K, Gill D & McMillan NA. 2004. Loss of PKR activity in chronic lymphocytic leukemia. *Int J Cancer* 109:329-335.

Holland EC. 2004. Regulation of translation and cancer. *Cell Cycle* 3:452-455.



Holland EC, Sonenberg N, Pandolfi PP & Thomas G. 2004. Signaling control of mRNA translation in cancer pathogenesis. *Oncogene* 23:3138-3144.

Holland JJ & Peterson JA. 1964. Nucleic Acid and Protein Synthesis during Poliovirus Infection of Human Cells. *J Mol Biol* 8:556-575.

Horzinek M. 1969. A simple method for concentration of arboviruses propagated in tissue culture. *Am J Trop Med Hyg* 18:588-591.

Huang JT & Schneider RJ. 1991. Adenovirus inhibition of cellular protein synthesis involves inactivation of cap-binding protein. *Cell* 65:271-280.

Huisman H. 1971. Host cell protein synthesis after infection with bluetongue virus and reovirus. *Virology* 46:500-503.

# I

Ikegami T, Narayanan K, Won S, Kamitani W, Peters CJ & Makino S. 2009. Rift Valley fever virus NSs protein promotes post-transcriptional downregulation of protein kinase PKR and inhibits eIF2alpha phosphorylation. *PLoS Pathog* 5:e1000287.

Imataka H & Sonenberg N. 1997. Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) possesses two separate and independent binding sites for eIF4A. *Mol Cell Biol* 17:6940-6947.

Inglis SC. 1982. Inhibition of host protein synthesis and degradation of cellular mRNAs during infection by influenza and herpes simplex virus. *Mol Cell Biol* 2:1644-1648.

Irusta PM & Hardwick JM. 2004. Neuronal apoptosis pathways in Sindbis virus encephalitis. *Prog Mol Subcell Biol* 36:71-93.

## J

Jackson AC, Moench TR, Trapp BD & Griffin DE. 1988. Basis of neurovirulence in Sindbis virus encephalomyelitis of mice. *Lab Invest* 58:503-509.

Jackson RJ, Hellen CU & Pestova TV. 2010. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:113-127.

Jacquemont B & Roizman B. 1975. RNA synthesis in cells infected with herpes simplex virus. X. Properties of viral symmetric transcripts and of double-stranded RNA prepared from them. *J Virol* 15:707-713.

Jan JT & Griffin DE. 1999. Induction of apoptosis by Sindbis virus occurs at cell entry and does not require virus replication. *J Virol* 73:10296-10302.

Joachims M, Van Breugel PC & Lloyd RE. 1999. Cleavage of poly(A)-binding protein by enterovirus proteases concurrent with inhibition of translation in vitro. *J Virol* 73:718-727.

## K

Kaariainen L & Ranki M. 1984. Inhibition of cell functions by RNA-virus infections. *Annu Rev Microbiol* 38:91-109.

Katze MG & Agy MB. 1990. Regulation of viral and cellular RNA turnover in cells infected by eukaryotic viruses including HIV-1. *Enzyme* 44:332-346.

Katze MG, He Y & Gale M, Jr. 2002. Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol* 2:675-687.

Kawai T & Akira S. 2009. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol* 21:317-337.

Kerekatte V, Keiper BD, Badorff C, Cai A, Knowlton KU & Rhoads RE. 1999. Cleavage of Poly(A)-binding protein by coxsackievirus 2A protease in vitro and *in vivo*: another mechanism for host protein synthesis shutoff? *J Virol* 73:709-717.

Kertesz M, Wan Y, Mazor E, Rinn JL, Nutter RC, Chang HY & Segal E. Genome-wide measurement of RNA secondary structure in yeast. *Nature* 467:103-107.

Kertesz M, Wan Y, Mazor E, Rinn JL, Nutter RC, Chang HY & Segal E. 2010. Genome-wide measurement of RNA secondary structure in yeast. *Nature* 467:103-107.

Kieft JS. 2008. Viral IRES RNA structures and ribosome interactions. *Trends Biochem Sci* 33:274-283.

Kimball SR. 1999. Eukaryotic initiation factor eIF2. *Int J Biochem Cell Biol* 31:25-29.

Kirn D. 2001. Oncolytic virotherapy for cancer with the adenovirus dl1520 (Onyx-015): results of phase I and II trials. *Expert Opin Biol Ther* 1:525-538.

Kleijn M, Vrans CL, Voorma HO & Thomas AA. 1996. Phosphorylation state of the cap-binding protein eIF4E during viral infection. *Virology* 217:486-494.

Klimstra WB, Nangle EM, Smith MS, Yurochko AD & Ryman KD. 2003. DC-SIGN and L-SIGN can act as attachment receptors for alphaviruses and distinguish between mosquito cell- and mammalian cell-derived viruses. *J Virol* 77:12022-12032.

Kojima E, Takeuchi A, Haneda M, Yagi A, Hasegawa T, Yamaki K, Takeda K, Akira S, Shimokata K & Isobe K. 2003. The function of GADD34 is a recovery from a shutoff of protein synthesis induced by ER stress: elucidation by GADD34-deficient mice. *Faseb J* 17:1573-1575.

Kozak M. 1987. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 15:8125-8148.

Kozak M. 1988. Leader length and secondary structure modulate mRNA function under conditions of stress. *Mol Cell Biol* 8:2737-2744.

Kozak M. 1990. Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:8301-8305.

Kozak M. 1991. Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J Biol Chem* 266:19867-19870.

## L

Lai EC. 2002. Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet* 30:363-364.

Langland JO, Cameron JM, Heck MC, Jancovich JK & Jacobs BL. 2006. Inhibition of PKR by RNA and DNA viruses. *Virus Res* 119:100-110.

Langland JO & Jacobs BL. 2002. The role of the PKR-inhibitory genes, E3L and K3L, in determining vaccinia virus host range. *Virology* 299:133-141.

Lawrence JC, Jr. & Abraham RT. 1997. PHAS/4E-BPs as regulators of mRNA translation and cell proliferation. *Trends Biochem Sci* 22:345-349.

Le H, Tanguay RL, Balasta ML, Wei CC, Browning KS, Metz AM, Goss DJ & Gallie DR. 1997. Translation initiation factors eIF-iso4G and eIF-4B interact with the poly(A)-binding protein and increase its RNA binding activity. *J Biol Chem* 272:16247-16255.

Lee JM. 2003. The role of protein elongation factor eEF1A2 in ovarian cancer. *Reprod Biol Endocrinol* 1:69.

Leegwater PA, Vermeulen G, Konst AA, Naidu S, Mulders J, Visser A, Kersbergen P, Mobach D, Fonds D, van Berkel CG, Lemmers RJ, Frants RR, Oudejans CB, Schutgens RB, Pronk JC & van der Knaap MS. 2001. Subunits of the translation initiation factor eIF2B are mutant in leukoencephalopathy with vanishing white matter. *Nat Genet* 29:383-388.

Liu CY & Kaufman RJ. 2003. The unfolded protein response. *J Cell Sci* 116:1861-1862.

Liu TC, Galanis E & Kirn D. 2007. Clinical trial results with oncolytic virotherapy: a century of promise, a decade of progress. *Nat Clin Pract Oncol* 4:101-117.

Liu WJ, Wang XJ, Clark DC, Lobigs M, Hall RA & Khromykh AA. 2006. A single amino acid substitution in the West Nile virus nonstructural protein NS2A disables its ability to inhibit alpha/beta interferon induction and attenuates virus virulence in mice. *J Virol* 80:2396-2404.

Lundstrom K. 2000. Alphavirus vectors: applications for DNA vaccine production and gene expression. *Intervirology* 43:247-257.

Lundstrom K. 2005. Biology and application of alphaviruses in gene therapy. *Gene Ther* 12 Suppl 1:S92-97.

Lustig S, Jackson AC, Hahn CS, Griffin DE, Strauss EG & Strauss JH. 1988. Molecular basis of Sindbis virus neurovirulence in mice. *J Virol* 62:2329-2336.

Lytle JR, Wu L & Robertson HD. 2002. Domains on the hepatitis C virus internal ribosome entry site for 40s subunit binding. *Rna* 8:1045-1055.

## M

Mathews DH. 2006. Revolutions in RNA secondary structure prediction. *J Mol Biol* 359:526-532.

Maziere P & Enright AJ. 2007. Prediction of microRNA targets. *Drug Discov Today* 12:452-458.

McFadden G, Mohamed MR, Rahman MM & Bartee E. 2009. Cytokine determinants of viral tropism. *Nat Rev Immunol* 9:645-655.

McSharry J & Benzinger R. 1970. Concentration and purification of vesicular stomatitis virus by polyethylene glycol "precipitation". *Virology* 40:745-746.

Meyuhas O. 2000. Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. *Eur J Biochem* 267:6321-6330.

Miron M, Lasko P & Sonenberg N. 2003. Signaling from Akt to FRAP/TOR targets both 4E-BP and S6K in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 23:9117-9126.

Mohammad-Qureshi SS, Jennings MD & Pavitt GD. 2008. Clues to the mechanism of action of eIF2B, the guanine-nucleotide-exchange factor for translation initiation. *Biochem Soc Trans* 36:658-664.

Mohr I. 2004. Neutralizing innate host defenses to control viral translation in HSV-1 infected cells. *Int Rev Immunol* 23:199-220.

## N

Namy O, Moran SJ, Stuart DI, Gilbert RJ & Brierley I. 2006. A mechanical explanation of RNA pseudoknot function in programmed ribosomal frameshifting. *Nature* 441:244-247.

Nanda K, Vancini R, Ribeiro M, Brown DT & Hernandez R. 2009. A high capacity Alphavirus heterologous gene delivery system. *Virology* 390:368-373.

Nicola AV, Chen W & Helenius A. 1999. Co-translational folding of an alphavirus capsid protein in the cytosol of living cells. *Nat Cell Biol* 1:341-345.

Nomura T & Rubin H. 1988. Quantitative studies of amino acid and growth factor requirements of transformed and nontransformed cells in high concentrations of serum or lymph. *In Vitro Cell Dev Biol* 24:878-884.

Norman KL, Hirasawa K, Yang AD, Shields MA & Lee PW. 2004. Reovirus oncolysis: the Ras/RalGEF/p38 pathway dictates host cell permissiveness to reovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:11099-11104.

# O

Oliva JL, Zarich N, Martinez N, Jorge R, Castrillo A, Azanedo M, Garcia-Vargas S, Gutierrez-Eisman S, Juarranz A, Bosca L, Gutkind JS & Rojas JM. 2004. The P34G mutation reduces the transforming activity of K-Ras and N-Ras in NIH 3T3 cells but not of H-Ras. *J Biol Chem* 279:33480-33491.

Onuki R, Bando Y, Suyama E, Katayama T, Kawasaki H, Baba T, Tohyama M & Taira K. 2004. An RNA-dependent protein kinase is involved in tunicamycin-induced apoptosis and Alzheimer's disease. *EMBO J* 23:959-968.

Orom UA & Lund AH. Experimental identification of microRNA targets. *Gene* 451:1-5.

Parato KA, Senger D, Forsyth PA & Bell JC. 2005. Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours. *Nat Rev Cancer* 5:965-976.

# P

Parsyan A, Shahbazian D, Martineau Y, Petroulakis E, Alain T, Larsson O, Mathonnet G, Tettweiler G, Hellen CU, Pestova TV, Svitkin YV & Sonenberg N. 2009. The helicase protein DHX29 promotes translation initiation, cell proliferation, and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:22217-22222.

Paschen W, Hayashi T, Saito A & Chan PH. 2004. GADD34 protein levels increase after transient ischemia in the cortex but not in the CA1 subfield: implications for post-ischemic recovery of protein synthesis in ischemia-resistant cells. *J Neurochem* 90:694-701.



Patel RC & Sen GC. 1992. Identification of the double-stranded RNA-binding domain of the human interferon-inducible protein kinase. *J Biol Chem* 267:7671-7676.

Pause A, Belsham GJ, Gingras AC, Donze O, Lin TA, Lawrence JC, Jr. & Sonenberg N. 1994. Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature* 371:762-767.

Pelletier J & Sonenberg N. 1985. Insertion mutagenesis to increase secondary structure within the 5' noncoding region of a eukaryotic mRNA reduces translational efficiency. *Cell* 40:515-526.

Pelletier J & Sonenberg N. 1988. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334:320-325.

Peng J, Murray EL & Schoenberg DR. 2008. *In vivo* and in vitro analysis of poly(A) length effects on mRNA translation. *Methods Mol Biol* 419:215-230.

Pestova TV, Hellen CU & Shatsky IN. 1996. Canonical eukaryotic initiation factors determine initiation of translation by internal ribosomal entry. *Mol Cell Biol* 16:6859-6869.

Pestova TV & Kolupaeva VG. 2002. The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes Dev* 16:2906-2922

Pestova TV, Lomakin IB & Hellen CU. 2004. Position of the CrPV IRES on the 40S subunit and factor dependence of IRES/80S ribosome assembly. *EMBO Rep* 5:906-913.

Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Naslund TI, Liljestrom P, Weber F & Reis e Sousa C. 2006. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* 314:997-1001.

Pickering BM & Willis AE. 2005. The implications of structured 5' untranslated regions on translation and disease. *Semin Cell Dev Biol* 16:39-47.

Piron M, Vende P, Cohen J & Poncet D. 1998. Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *Embo J* 17:5811-5821.

Pisareva VP, Pisarev AV, Komar AA, Hellen CU & Pestova TV. 2008. Translation initiation on mammalian mRNAs with structured 5'UTRs requires DExH-box protein DHX29. *Cell* 135:1237-1250.

Proud CG. 2006. Regulation of protein synthesis by insulin. *Biochem Soc Trans* 34:213-216.

Ptushkina M, von der Haar T, Karim MM, Hughes JM & McCarthy JE. 1999. Repressor binding to a dorsal regulatory site traps human eIF4E in a high cap-affinity state. *Embo J* 18:4068-4075.

## R

Rane S, Sayed D & Abdellatif M. 2007. MicroRNA with a MacroFunction. *Cell Cycle* 6:1850-1855.

Rice CM, Levis R, Strauss JH & Huang HV. 1987. Production of infectious RNA transcripts from Sindbis virus cDNA clones: mapping of lethal mutations, rescue of a temperature-sensitive marker, and in vitro mutagenesis to generate defined mutants. *J Virol* 61:3809-3819.

Richardson JP, Mohammad SS & Pavitt GD. 2004. Mutations causing childhood ataxia with central nervous system hypomyelination reduce eukaryotic initiation factor 2B complex formation and activity. *Mol Cell Biol* 24:2352-2363.

Richter JD. 1999. Cytoplasmic polyadenylation in development and beyond. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:446-456.

Rodriguez JF, Rodriguez D, Rodriguez JR, McGowan EB & Esteban M. 1988. Expression of the firefly luciferase gene in vaccinia virus: a highly sensitive gene marker to follow virus dissemination in tissues of infected animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:1667-1671.

Rogers GW, Jr., Komar AA & Merrick WC. 2002. eIF4A: the godfather of the DEAD box helicases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 72:307-331.

Rogers GW, Jr., Lima WF & Merrick WC. 2001. Further characterization of the helicase activity of eIF4A. Substrate specificity. *J Biol Chem* 276:12598-12608.

Rogers GW, Jr., Richter NJ, Lima WF & Merrick WC. 2001. Modulation of the helicase activity of eIF4A by eIF4B, eIF4H, and eIF4F. *J Biol Chem* 276:30914-30922.

Romano PR, Zhang F, Tan SL, Garcia-Barrio MT, Katze MG, Dever TE & Hinnebusch AG. 1998. Inhibition of double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR by vaccinia virus E3: role of complex formation and the E3 N-terminal domain. *Mol Cell Biol* 18:7304-7316.

Ron D. 2002. Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J Clin Invest* 110:1383-1388.

Rothenburg S, Seo EJ, Gibbs JS, Dever TE & Dittmar K. 2009. Rapid evolution of protein kinase PKR alters sensitivity to viral inhibitors. *Nat Struct Mol Biol* 16:63-70.

Ryman KD, Klimstra WB, Nguyen KB, Biron CA & Johnston RE. 2000. Alpha/beta interferon protects adult mice from fatal Sindbis virus infection and is an important determinant of cell and tissue tropism. *J Virol* 74:3366-3378.

## S

Samuel CE, Kuhen KL, George CX, Ortega LG, Rende-Fournier R & Tanaka H. 1997. The PKR protein kinase--an interferon-inducible regulator of cell growth and differentiation. *Int J Hematol* 65:227-237.

Sanz MA, Castello A & Carrasco L. 2007. Viral translation is coupled to transcription in Sindbis virus-infected cells. *J Virol* 81:7061-7068.

Schmid M & Wimmer E. 1994. IRES-controlled protein synthesis and genome replication of poliovirus. *Arch Virol Suppl* 9:279-289.

Schneider RJ & Mohr I. 2003. Translation initiation and viral tricks. *Trends Biochem Sci* 28:130-136.

Schneider RJ & Shenk T. 1987. Impact of virus infection on host cell protein synthesis. *Annu Rev Biochem* 56:317-332.

Schneider-Schaulies J. 2000. Cellular receptors for viruses: links to tropism and pathogenesis. *J Gen Virol* 81:1413-1429.

Schumann M & Dobbelstein M. 2006. Activating Ras mutations fail to ensure efficient replication of adenovirus mutants lacking VA-RNA. *Cell Cycle* 5:315-321.

Semler BL. 2004. Poliovirus proves IRES-istible in vivo. *J Clin Invest* 113:1678-1681.

Shatkin AJ. 1976. Capping of eucaryotic mRNAs. *Cell* 9:645-653.

Silvera D, Formenti SC & Schneider RJ. Translational control in cancer. *Nat Rev Cancer* 10:254-266.

Silverman RH. 2007. Viral encounters with 2',5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response. *J Virol* 81:12720-12729.

Skabkin MA, Skabkina OV, Dhote V, Komar AA, Hellen CU & Pestova TV. 2010. Activities of Ligatin and MCT-1/DENR in eukaryotic translation initiation and ribosomal recycling. *Genes Dev* 24:1787-1801.

Smit JM, Waarts BL, Kimata K, Klimstra WB, Bittman R & Wilschut J. 2002. Adaptation of alphaviruses to heparan sulfate: interaction of Sindbis and Semliki forest viruses with liposomes containing lipid-conjugated heparin. *J Virol* 76:10128-10137.

Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH & Schreiber RD. 1998. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67:227-264.

Stevenson AL & McCarthy JE. 2008. Found in translation: another RNA helicase function. *Mol Cell* 32:755-756.

Stojdl DF, Abraham N, Knowles S, Marius R, Brasey A, Lichty BD, Brown EG, Sonenberg N & Bell JC. 2000. The murine double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR is required for resistance to vesicular stomatitis virus. *J Virol* 74:9580-9585.

Stojdl DF, Lichty B, Knowles S, Marius R, Atkins H, Sonenberg N & Bell JC. 2000. Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nat Med* 6:821-825.

Strauss JH & Strauss EG. 1994. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol Rev* 58:491-562.

Strong JE, Coffey MC, Tang D, Sabinin P & Lee PW. 1998. The molecular basis of viral oncolysis: usurpation of the Ras signaling pathway by reovirus. *EMBO J* 17:3351-3362.

Sudhakar A, Ramachandran A, Ghosh S, Hasnain SE, Kaufman RJ & Ramaiah KV. 2000. Phosphorylation of serine 51 in initiation factor 2 alpha (eIF2 alpha) promotes complex formation between eIF2 alpha(P) and eIF2B and causes inhibition in the guanine nucleotide exchange activity of eIF2B. *Biochemistry* 39:12929-12938.

## T

Taga M, Ikeda M, Shigeta H & Hiraga M. 1999. Gene expression of double-stranded RNA-dependent protein kinase in the human endometrium and decidua. *Mol Cell Endocrinol* 158:65-68.

Tarun SZ, Jr. & Sachs AB. 1996. Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *Embo J* 15:7168-7177.

Taylor SS, Haste NM & Ghosh G. 2005. PKR and eIF2alpha: integration of kinase dimerization, activation, and substrate docking. *Cell* 122:823-825.

Teng MN, Whitehead SS, Bermingham A, St Claire M, Elkins WR, Murphy BR & Collins PL. 2000. Recombinant respiratory syncytial virus that does not express the NS1 or M2-2 protein is highly attenuated and immunogenic in chimpanzees. *J Virol* 74:9317-9321.

Toribio R & Ventoso I. 2010. Inhibition of host translation by virus infection in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:9837-9842.

Toroney R, Nallagatla SR, Boyer JA, Cameron CE & Bevilacqua PC. 2010. Regulation of PKR by HCV IRES RNA: importance of domain II and NS5A. *J Mol Biol* 400:393-412.

Toth K, Dhar D & Wold WS. Oncolytic (replication-competent) adenoviruses as anticancer agents. *Expert Opin Biol Ther* 10:353-368.

Tseng JC, Levin B, Hirano T, Yee H, Pampero C & Meruelo D. 2002. In vivo antitumor activity of Sindbis viral vectors. *J Natl Cancer Inst* 94:1790-1802.

Tuller T, Carmi A, Vestsigian K, Navon S, Dorfan Y, Zaborske J, Pan T, Dahan O, Furman I & Pilpel Y. 2010. An evolutionarily conserved mechanism for controlling the efficiency of protein translation. *Cell* 141:344-354.

## V

Vaha-Koskela MJ, Kallio JP, Jansson LC, Heikkilä JE, Zakhartchenko VA, Kallajoki MA, Kahari VM & Hinkkanen AE. 2006. Oncolytic capacity of attenuated replicative semliki forest virus in human melanoma xenografts in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res* 66:7185-7194.

van Steeg H, Thomas A, Verbeek S, Kasperaitis M, Voorma HO & Benne R. 1981. Shutoff of neuroblastoma cell protein synthesis by Semliki Forest virus: loss of ability of crude initiation factors to recognize early Semliki Forest virus and host mRNA's. *J Virol* 38:728-736.

Vende P, Piron M, Castagne N & Poncet D. 2000. Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3' end. *J Virol* 74:7064-7071.

Venticinque L & Meruelo D. Sindbis viral vector induced apoptosis requires translational inhibition and signaling through Mcl-1 and Bak. *Mol Cancer* 9:37.

Ventoso I, Berlanga JJ & Almendral JM. 2010. Translation control by protein kinase R restricts minute virus of mice infection: role in parvovirus oncolysis. *J Virol* 84:5043-5051.

Ventoso I, Berlanga JJ & Almendral JM. Translation control by protein kinase R restricts minute virus of mice infection: role in parvovirus oncolysis. *J Virol* 84:5043-5051.

Ventoso I, Sanz MA, Molina S, Berlanga JJ, Carrasco L & Esteban M. 2006. Translational resistance of late alphavirus mRNA to eIF2{alpha} phosphorylation: a strategy to overcome the antiviral effect of protein kinase PKR. *Genes Dev* 20:87-100.

Verpooten D, Feng Z, Valyi-Nagy T, Ma Y, Jin H, Yan Z, Zhang C, Cao Y & He B. 2009. Dephosphorylation of eIF2alpha mediated by the gamma134.5 protein of herpes simplex virus 1 facilitates viral neuroinvasion. *J Virol* 83:12626-12630.



Volarevic S, Stewart MJ, Ledermann B, Zilberman F, Terracciano L, Montini E, Grompe M, Kozma SC & Thomas G. 2000. Proliferation, but not growth, blocked by conditional deletion of 40S ribosomal protein S6. *Science* 288:2045-2047.

## W

Wang F, Gao X, Barrett JW, Shao Q, Bartee E, Mohamed MR, Rahman M, Werden S, Irvine T, Cao J, Dekaban GA & McFadden G. 2008. RIG-I mediates the co-induction of tumor necrosis factor and type I interferon elicited by myxoma virus in primary human macrophages. *PLoS Pathog* 4:e1000099.

Wang FI, Fleming JO & Lai MM. 1992. Sequence analysis of the spike protein gene of murine coronavirus variants: study of genetic sites affecting neuropathogenicity. *Virology* 186:742-749.

Warrier R, Linger BR, Golden BL & Kuhn RJ. 2008. Role of sindbis virus capsid protein region II in nucleocapsid core assembly and encapsidation of genomic RNA. *J Virol* 82:4461-4470.

Waskiewicz AJ, Johnson JC, Penn B, Mahalingam M, Kimball SR & Cooper JA. 1999. Phosphorylation of the cap-binding protein eukaryotic translation initiation factor 4E by protein kinase Mnk1 in vivo. *Mol Cell Biol* 19:1871-1880.

Watkins SJ & Norbury CJ. 2002. Translation initiation and its deregulation during tumorigenesis. *Br J Cancer* 86:1023-1027.

Watts JM, Dang KK, Gorelick RJ, Leonard CW, Bess JW, Jr., Swanstrom R, Burch CL & Weeks KM. 2009. Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome. *Nature* 460:711-716.

Weill L, James L, Ulryck N, Chamond N, Herbreteau CH, Ohlmann T & Sargueil B. 2010. A new type of IRES within gag coding region recruits three initiation complexes on HIV-2 genomic RNA. *Nucleic Acids Res* 38:1367-1381.

Wek RC & Cavener DR. 2007. Translational control and the unfolded protein response. *Antioxid Redox Signal* 9:2357-2371.

Wek RC, Jiang HY & Anthony TG. 2006. Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem Soc Trans* 34:7-11.

Wells SE, Hillner PE, Vale RD & Sachs AB. 1998. Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol Cell* 2:135-140.

Wilson DE. 1968. Inhibition of host-cell protein and ribonucleic acid synthesis by Newcastle disease virus. *J Virol* 2:1-6.

Wool IG, CYaGAHJ, Mathews MB, Sonenberg N. 1996. *Translational Control*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York:pp. 685–732.

## X

Xia X. 2007. The +4G site in Kozak consensus is not related to the efficiency of translation initiation. *PLoS One* 2:e188.

Xiong C, Levis R, Shen P, Schlesinger S, Rice CM & Huang HV. 1989. Sindbis virus: an efficient, broad host range vector for gene expression in animal cells. *Science* 243:1188-1191.

## Y

Yang L, Gu L, Li Z & Zhou M. 2010. Translation of TRAF1 is regulated by IRES-dependent mechanism and stimulated by vincristine. *Nucleic Acids Res* 38:4503-4513.

Yang YL, Reis LF, Pavlovic J, Aguzzi A, Schafer R, Kumar A, Williams BR, Aguet M & Weissmann C. 1995. Deficient signaling in mice devoid of double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Embo J* 14:6095-6106.

Yueh A & Schneider RJ. 2000. Translation by ribosome shunting on adenovirus and hsp70 mRNAs facilitated by complementarity to 18S rRNA. *Genes Dev* 14:414-421.

## Z

Zhang Y, Feigenblum D & Schneider RJ. 1994. A late adenovirus factor induces eIF-4E dephosphorylation and inhibition of cell protein synthesis. *J Virol* 68:7040-7050.

